

Efectos de las fuentes de nitrógeno en la micorrización con *Tuber melanosporum* y en la calidad de planta de *Quercus ilex*.

Máster en Restauración de Ecosistemas



Presentado por:

Lara Río Moreno

Directora Académica:

Mercedes Uscola Fernández

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Material y métodos	6
Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas	6
Material fúngico y proceso de inoculación.....	8
Fertilización	9
Seguimiento durante el cultivo	10
Análisis estadísticos.....	14
Resultados	15
Fenología	15
Morfología durante el cultivo	16
Desarrollo radical y grado de micorrización	19
Parámetros fisiológicos	20
Características químicas en el extracto acuoso del sustrato de cultivo.	23
Discusión.....	24
Efectos de la fertilización con distintas fuentes de N en la micorrización con <i>T. melanosporum</i>	24
Efectos de la fertilización con distintas fuentes de N en la calidad de planta	26
Siguiendo pasos y futuras investigaciones.....	29
Conclusiones.....	30
Agradecimientos	31
Bibliografía.....	31
Material suplementario.....	37

Resumen

Una de las técnicas más utilizadas en la restauración de ecosistemas es la revegetación. Con el fin de aumentar el éxito de las revegetaciones, es importante mejorar la calidad de las plantas en vivero. Las principales técnicas de mejora de la calidad de planta son la fertilización y la micorrización. Ambas técnicas tienden a no utilizarse simultáneamente porque la fertilización suele tener efectos negativos en la micorrización. Este trabajo intenta analizar los efectos de la fertilización con diferentes fuentes de N en la calidad de planta de *Quercus ilex* y en su micorrización con *Tuber melanosporum*. Se llevó a cabo un experimento factorial completo con: (1) tipo de inoculación (a) sin inoculación o (b) con *T. melanosporum*; y (2) fertilizante en función de la fuente de N: (a) amonio; (b) nitrato; (c) N orgánico; (d) N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio); (e) mezcla completa (mezcla equimolar de las tres fuentes de N); y (f) control sin fertilizante. Se midieron atributos de las plantas indicadores de su calidad: crecimiento, contenido en clorofilas y eficiencia fotosintética, así como su grado de micorrización durante el cultivo. La fertilización aumentó la calidad de planta, ya que incrementó el crecimiento al final del cultivo y favoreció parámetros fisiológicos relacionados con la capacidad fotosintética. El N orgánico fue la fuente de N más adecuada para el cultivo de *Q. ilex*, ya que optimizó tanto el contenido de clorofilas como la eficiencia fotosintética de las plantas, sin reducir el crecimiento. El tiempo transcurrido desde la inoculación no fue suficiente para el desarrollo de micorrizas. Sin embargo, se encontraron efectos de la inoculación dependientes de la fuente de N. En general, la inoculación aceleró la fenología induciendo una parada del crecimiento más temprana, especialmente cuando las plantas fueron cultivadas con nitrato. La fuente de N que, en presencia de inoculación, dio lugar a las mejores características de planta para el establecimiento de una posible micorrización fue la mezcla completa. Dicha fuente de N aumentó el desarrollo radical y optimizó los parámetros fotosintéticos.

Palabras clave: nitrato; amonio; nitrógeno orgánico; fertilizante convencional; crecimiento; clorofilas; eficiencia fotosintética.

Abstract

One of the most used techniques in ecosystem restoration is revegetation. Improve plant quality in the nursery increases the success of revegetation. The main techniques for improving plant quality are fertilization and mycorrhization. Generally, both techniques are not used simultaneously, because fertilization usually reduce the success of mycorrhization. The main objective is to analyze the effects of fertilization with different N forms on the development of *Quercus ilex* seedlings and its mycorrhization with *Tuber melanosporum*. A full factorial design was carried out with: (1) inoculation (a) without inoculation or (b) inoculation with *T. melanosporum*; and (2) N form- based fertilizer: (a) ammonium; (b) nitrate; (c) organic N; (d) inorganic N (equimolar mixture of nitrate and ammonium); (e) full mix (equimolar mixture of the three N forms); and also including a control without fertilizer (f). We measured different plant traits: growth, chlorophyll content and photosynthetic efficiency during cultivation, as well as the mycorrhization index. Fertilization increased plant quality, fertilized seedlings increased growth at the end of the culture and improved physiological parameters related to photosynthetic capacity over non-fertilized ones. Among N forms, organic N fed plants improved both the chlorophyll content and the photosynthetic efficiency of the seedlings without decreasing growth. Thus, organic N was the most suitable N form for the culture of *Q. ilex* seedlings. The elapsed time since inoculation to the last harvesting was not enough for the development of mycorrhizae. However, inoculation affected seedling traits as a function of N form, accelerating phenology with earlier growth cessation, specially under nitrate fertilization. Results suggest that mycorrhization of *Q. ilex* seedlings could be maximized under culture with full mix fertilizer. Full mix gave rise to the best plant characteristics i.e. higher root development and improved photosynthetic parameters.

Key words: nitrate; ammonium; organic N; growth; chlorophyll; photosynthetic efficiency.

Introducción

Una de las técnicas más empleadas en la restauración de ecosistemas es la revegetación (Vargas Ríos, 2011). Las revegetaciones proveen servicios ecosistémicos tales como retención del suelo, provisión de hábitat, fijación de carbono, y beneficios económicos en forma de bienes, como madera, frutos y hongos comestibles (Millenium ecosystem assessment, 2005; Rey Benayas et al., 2009; Cortina et al., 2011; De Groot et al., 2013). En la zona mediterránea, el éxito de las revegetaciones está limitado por las altas temperaturas y las bajas precipitaciones del periodo estival, limitaciones que se verán acentuadas en un contexto de cambio climático (Lionello et al., 2006; Giorgi y Lionello, 2008). Con el objetivo de aumentar el éxito de las revegetaciones, se han desarrollado, entre otras, nuevas técnicas de preparación del suelo, así como diversos métodos para la mejora de la calidad de planta (Cortina et al., 2004, 2013; Chirino et al., 2009; Ruthrof et al., 2013).

Producir plantas de mayor calidad en los viveros favorece su establecimiento en el campo, así como su tolerancia a estrés y su crecimiento tras la plantación (Chirino et al., 2009; Villar-Salvador et al., 2012, 2013, 2015). Para aumentar la calidad de las plantas, se recurre a técnicas como el endurecimiento en vivero, la fertilización y/o la micorrización (Chirino et al., 2009; Cortina et al., 2013). Entre estas, la técnica más ampliamente utilizada es la fertilización, debido a sus buenos resultados y a su bajo coste (Chirino et al., 2009; Cortina et al., 2013). Las plantas altamente fertilizadas, acumulan reservas, tienen un sistema radical más desarrollado y, por tanto, tienen mayor capacidad de crecimiento y establecimiento en campo (Villar-Salvador et al., 2012, 2013; Cortina et al., 2013). Actualmente, con el fin de mejorar la calidad de planta, se está dando mayor consideración a las interacciones bióticas, como la micorrización (Pera y Parladé, 2005). La micorrización es una simbiosis planta - hongo gracias a la cual la planta amplía su capacidad de absorción de agua y nutrientes, mientras que el hongo recibe carbohidratos (Nardini et al., 2000; Tibbett y Sanders, 2002; Pera y Parladé, 2005). Se ha comprobado una mejora del estatus de las plantas micorrizadas en el primer año tras la plantación, lo que se traduce en una mejora de la supervivencia (Hatch, 1937; Pera y Parladé, 2005; Domínguez Núñez et al., 2006). Sin embargo, las plantas inoculadas no suelen fertilizarse, ya que la fertilización puede inhibir el proceso de micorrización (Treseder,

2004; Díaz et al., 2009; Fischer et al., 2009), reduciendo su calidad. Por otro lado, esta inhibición no se presenta en todos los casos, sino que depende de la especie de hongo y de la dosis de fertilizante (Díaz et al., 2009; Garcia-Barreda et al., 2017).

Entre los nutrientes que se aportan en la fertilización, el más importante es el nitrógeno (N), ya que se encuentra en los ácidos nucleicos y en las proteínas como, por ejemplo, las que forman parte de la maquinaria fotosintética (Evans y Sorger, 1966; Mengel et al., 2001; Taiz y Zeiger, 2006d). Además, es un elemento limitante en la mayoría de los ecosistemas, como los mediterráneos y, especialmente, en los que requieren una restauración (Vitousek y Howarth, 1991; Bonilla y Rodà, 1992; LeBauer y Treseder, 2008; Delgado-Baquerizo et al., 2011). Las plantas pueden asimilar el N a partir de distintos compuestos inorgánicos, como el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+), o a partir de N orgánico, como los aminoácidos y las proteínas (Paungfoo-Lonhienne et al., 2008; Näsholm et al., 2009). Aunque las plantas pueden absorber N en todas estas formas, muestran mayores tasas de absorción de fuentes de N concretas según la especie (Kielland et al., 2006; Metcalfe et al., 2011; Uscola et al., 2017). Estas preferencias están asociadas a una distinta respuesta morfofisiológica de las plantas, según la fuente de N con la que sean cultivadas (Metcalfe et al., 2011; Uscola et al., 2013). Por ello, es importante estudiar los efectos de la fertilización con distintas fuentes de N.

La fertilización convencional utiliza fuentes de N inorgánicas (Landis D., 1989; Taiz y Zeiger, 2006d). La fertilización con nitrato se traduce en menores tasas de crecimiento, debido a su alto coste metabólico (Raven et al., 1992). Además, el nitrato tiene una alta movilidad en el sustrato por lo que es fácilmente lixiviado, pudiendo causar grandes problemas de contaminación en las zonas adyacentes (Raven et al., 1992; Galloway et al., 2003). Sin embargo, la fertilización con amonio tiene un fuerte efecto estimulante del crecimiento, pero puede retrasar el endurecimiento (Jacobs y Landis, 2009). Por otro lado, la fertilización con amonio presenta mayores problemas de toxicidad que la fertilización con nitrato (Britto y Kronzucker, 2002; Uscola et al., 2013). Ambas fuentes de N causan desequilibrios en la absorción de otros nutrientes, mientras el amonio favorece la absorción de P^- e inhibe la de K^+ , el nitrato produce el efecto contrario (Raven y Smith, 1976; Uscola et al., 2013). Para evitar los inconvenientes que causan estas fuentes de N individualmente, los viveros suelen utilizar mezclas de nitrato y amonio

(Raven y Smith, 1976; Landis D., 1989; Taiz y Zeiger, 2006d). Otra desventaja de la aplicación de fertilizantes inorgánicos, es que aumentan la salinidad y modifican el pH del sustrato de cultivo, mientras el amonio acidifica el sustrato, el nitrato tiende a basificarlo (Landis et al., 1989; Chen, 2006). Esto puede limitar el éxito de la micorrización, ya que algunos hongos son muy sensibles a los cambios en salinidad y requieren rangos concretos de pH (García-Montero et al., 2006; Taylor, 2018).

Aunque se ha demostrado que las plantas pueden utilizar fuentes de N orgánicas, su utilización en la fertilización apenas se ha abordado (sin embargo ver Gruffman et al., 2012; Sigala et al., 2019) y, que sepamos, jamás se han estudiado sus efectos sobre la micorrización. Dado que los aminoácidos son los constituyentes iniciales de las proteínas, el coste metabólico de su uso es mucho menor que el de las fuentes de N inorgánicas (Taiz y Zeiger, 2006a). Esto se traduciría en una mayor energía disponible y, por tanto, en un aporte extra de C que podría favorecer el crecimiento y aumentar las reservas de las plantas (Näsholm et al., 2009; Franklin et al., 2017). Otra ventaja de utilizar fuentes de N orgánicas es la posibilidad de obtener el certificado de cultivo ecológico, con el que se es susceptible de percibir subvenciones ecológicas (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2018). Además, los aminoácidos, al ser un grupo complejo con distintas cargas (neutras, ácidas y básicas), no variarían drásticamente el pH del sustrato y tendrían menor efecto negativo en la salinidad. Estas ventajas, sugieren que la utilización de fuentes de N orgánico puede ser una solución para compatibilizar la fertilización y la micorrización y, así, optimizar la calidad de planta.

Quercus ilex es una especie clave en los ecosistemas mediterráneos y una de las más usadas en repoblaciones en la Península Ibérica (Blanco et al., 1998; Rodà et al., 1999; Benayas y Camacho, 2004). *Quercus ilex* forma simbiosis con diversos hongos ectomicorrícicos (Bergero et al., 2000; Richard et al., 2005). Entre estos hongos se encuentra el género *Tuber*., por ejemplo, *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum* y *Tuber borchiii*. Todas estas especies son nativas de los ecosistemas mediterráneos, especialmente de Francia, Italia y España (Ceruti et al., 2003; Aumeeruddy-Thomas et al., 2016). Los carpóforos de estas especies son las denominadas trufas, que son muy apreciadas económicamente por su alta demanda gastronómica. Entre estas especies, la de mayor valor económico es *T. melanosporum*, cuyo carpóforo es la trufa negra (Palmer

A. y Filoso, 2009; Reyna y Garcia-Barreda, 2014; Aumeeruddy-Thomas et al., 2016). La utilización de *T. melanosporum* aporta beneficios económicos, tanto por la venta directa de la trufa como estimulando actividades asociadas, tales como viveros forestales o empresas de productos alimenticios manufacturados, aumentando así las rentas en las zonas agrarias y contribuyendo a la fijación de la población rural (Samils et al., 2003, 2008; Bonet et al., 2006; Martínez De Aragón et al., 2012). Por ello, la utilización de *T. melanosporum* en reforestaciones es cada vez más frecuente y ha demostrado su éxito promoviendo actividades económicas en las zonas en las que se ha implantado (Samils et al., 2003, 2008). Es por esto que, encontrar una manera de conciliar la fertilización de *Q. ilex* y su micorrización con *T. melanosporum*, aportaría enormes beneficios tanto a la sociedad como al medio ambiente.

El objetivo de este proyecto es analizar el efecto de diferentes fuentes de N, tanto inorgánicas (NO_3^- y NH_4^+) como orgánicas (aminoácidos), en el crecimiento de *Q. ilex* y en su capacidad de micorrizar con *T. melanosporum*. Específicamente, se evaluarán las siguientes hipótesis: i) la fertilización promoverá el desarrollo de las plantas, especialmente en aquellas fertilizadas con N orgánico; y ii) la micorrización con *T. melanosporum* dependerá de la fuente de N, siendo favorecida cuando las plantas sean fertilizadas con N orgánico.

Material y métodos

Se llevó a cabo un experimento factorial completo con 2 variables: (a) **tipo de inoculación** con 2 niveles: sin inoculación o con *Tuber melanosporum*; y (b) fertilizante en función de la **fuentes de N** con 6 niveles: (1) amonio (NH_4^+); (2) nitrato (NO_3^-); (3) N orgánico (mezcla de aminoácidos, AA); (4) N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio; $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$); (5) mezcla completa (mezcla equimolar de las tres fuentes de N: nitrato, amonio y N orgánico; $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{AA}$); y (6) control sin fertilizante.

Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas

Se utilizaron semillas de *Quercus ilex* de la Alcarria y la Serranía de Cuenca cosechadas en 2018 (región de procedencia ES09), obtenidas del Centro de Recursos Genéticos Forestales “El Serranillo”. Las bellotas se almacenaron en bolsas de plástico en nevera a

4°C hasta su utilización. En febrero del 2019, las semillas se esterilizaron mediante repetidos lavados de 20 minutos con lejía al 10%, se seleccionaron las semillas viables por flotación y se eliminaron aquellas muy pequeñas o con signos de daños externos. Para comprobar la calidad de las semillas, se analizó el contenido en humedad ($35 \pm 2 \%$; $n=11$). Posteriormente, las semillas se pregerminaron en perlita húmeda (Projar, España) a temperatura ambiente, en los laboratorios del departamento de Ciencias de la Vida, Unidad Docente de Ecología de la Universidad de Alcalá. Se controló la humedad del sustrato y la germinación hasta que se contabilizó un gran número de semillas germinadas y con un desarrollo de raíz suficiente para comenzar el semillado.

El 25 de febrero de 2019 se comenzó la siembra de las semillas pregerminadas (Figura 1). Las bellotas pregerminadas se sembraron en 24 bandejas forestales de 35 alveolos con un volumen de 350 cm³ cada uno, evitando los embriones gemelos y las semillas con radículas rotas o con la punta seca. Previamente, las bandejas fueron desinfectadas con lejía al 10%. El sustrato de cultivo fue una mezcla de 5:1 (V:V) de turba rubia sin fertilizar (Kekkilä Professional, Finlandia) y piedra caliza (CaCO₃ 97.5%, granulometría 3 mm, Tricalsa, España). La piedra caliza se añadió para basificar el pH y hacerlo óptimo para *T. melanosporum* (Jaillard et al., 2016). Una vez sembradas, se cubrieron los alveolos con perlita (granulometría 1-5 mm, Projar, España). El semillado concluyó cuando se completaron las bandejas, con un total de 840 semillas pregerminadas plantadas (18 de marzo).

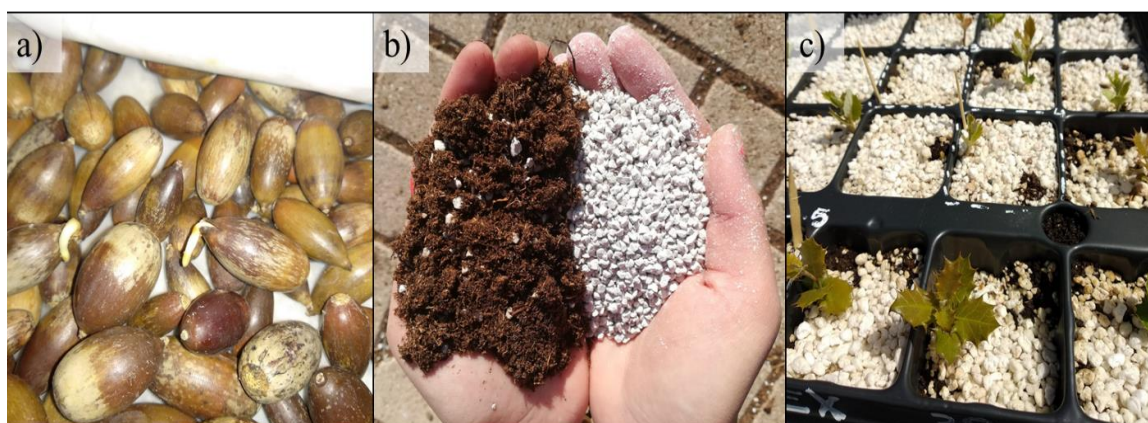


Figura 1. Proceso de semillado de *Q. ilex* durante el experimento: a) pregerminación de las semillas; b) sustratos utilizados, a la izquierda turba rubia sin fertilizar, a la derecha piedra caliza de pequeña granulometría; y c) plántulas emergidas en bandejas forestales rellenas de sustrato y cubiertas con perlita.

Las bandejas se dispusieron en un túnel de cultivo de las instalaciones del Real Jardín Botánico Juan Carlos I de la Universidad de Alcalá (40°30'24,00"N, 3°20'45,60"O, 600 msnm). Las bandejas se mantuvieron en suspensión a 25 cm del suelo, para evitar el enraizamiento de los plantones en el suelo, y bajo una malla de sombreo con una reducción de luz del 30%. Se regó regularmente a saturación, 1- 2 veces por semana, según fuera necesario, hasta el inicio de la fertilización. Además, se instalaron dos sensores grabadores de datos de temperatura y radiación (Pendant Temp/luminosidad, Onset, EEUU) en puntos separados del túnel de cultivo a la misma altura que las plantas, aunque sin recibir sombra de ellas, programados para tomar datos cada hora (ver figura S1 en material suplementario).

Material fúngico y proceso de inoculación

Se obtuvieron 500 g de esporocarpos de *Tuber melanosporum* procedentes de la Alcarria recolectadas en enero de 2019. Se comprobó la calidad de cada esporocarpo, así como la madurez y la cantidad de sus esporas, mediante observación al microscopio óptico a 40X, acoplado a una cámara digital (MU900, Amscope, EEUU). Se encontró que todos los esporocarpos estaban en buen estado de conservación y que las esporas estaban maduras y en número adecuado ($>5 \times 10^6$ esporas g^{-1}), y se midió su contenido de humedad ($83 \pm 2\%$, $n=4$). Para la conservación del esporocarpo, éste se laminó y se secó en una estufa a 45 °C durante 48 horas. Posteriormente, se mantuvo en nevera a 4 °C hasta su utilización (Figura 2).

El 10 de junio, se inocularon la mitad de las plantas, seleccionando al azar la mitad de las bandejas (420 plantas por tipo de inóculo). El momento de inoculación se determinó en función de que la emergencia hubiera alcanzado el 90% y las plantas estuvieran iniciando la segunda metida. Para la preparación del inóculo, las láminas de *T. melanosporum* deshidratadas se rehidrataron hasta alcanzar el contenido hídrico inicial (82,6%), añadiendo el volumen correspondiente de agua destilada y dejándolo reposar durante 24 horas en el frigorífico a 4 °C. Una vez hidratada, se trituró la trufa hasta conseguir una mezcla fina y homogénea. Debido a que el análisis previo de *T. melanosporum* mostró buena calidad en las esporas, se añadió 1 gramo de esporocarpo fresco por planta, equivalente a 5×10^6 esporas por planta (Cartié et al., 2001). Para ello, se preparó una disolución de *T. melanosporum* con agua desionizada con concentración

de 100 g L⁻¹. Se administraron 10 ml planta⁻¹ de dicha disolución, inyectando 5 ml en cada uno de dos puntos distantes de la superficie del alveolo (Figura 2).

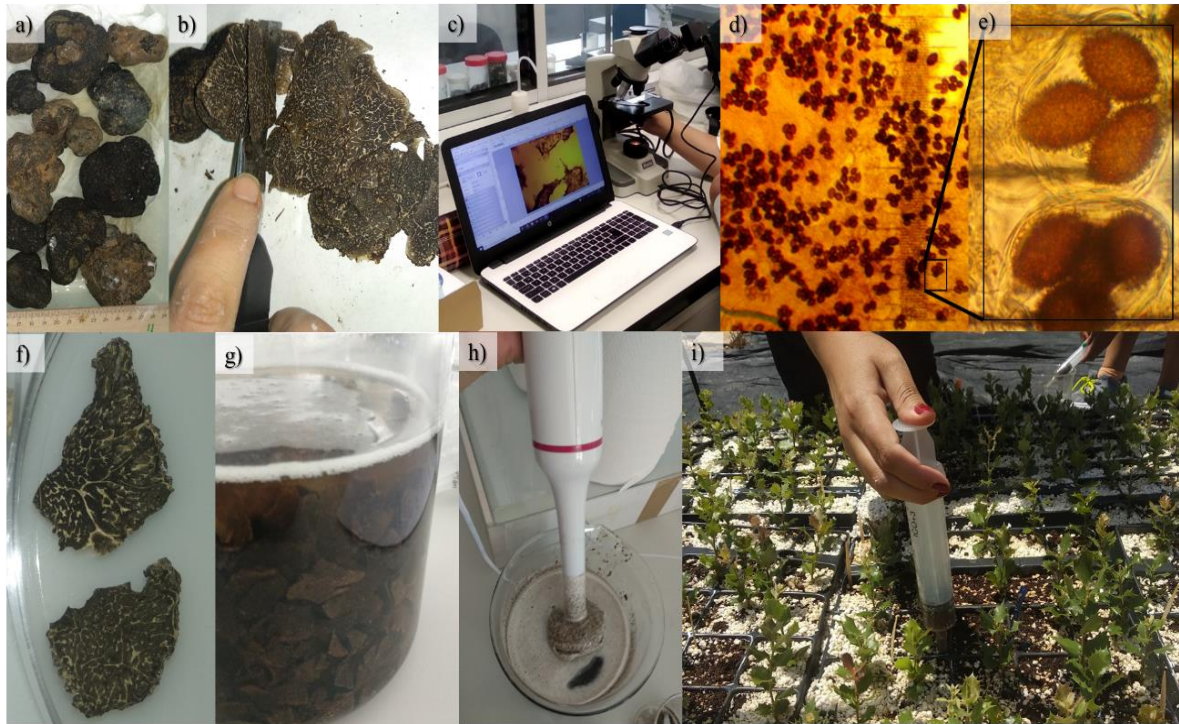


Figura 2. Esporocarpos de *Tuber melanosporum* (a) y su laminación para conservación (b); identificación de la especie de *Tuber* y caracterización de la calidad del esporocarpo para inóculo, mediante caracterización y cuantificación por microscopia de las esporas (c); detalle de esporas de *Tuber melanosporum* (escala 0.01mm) a 40x (d) y 100x (e); detalle de las láminas de trufa tras desecación (f); y preparación del inóculo (rehidratación -g, trituración -h) e inoculación de plantas de *Quercus ilex* (i).

Fertilización

El 3 de julio, cuando el 90% de las plantas había alcanzado la segunda metida, comenzó la fertilización. Se eligió este momento porque es cuando las plantas dejan de depender del N de la bellota y comienzan a utilizar el N del suelo (Villar-Salvador et al., 2009). Se establecieron 6 tratamientos de fertilización, a los que se asignaron al azar dos bandejas por cada tratamiento de inoculación (140 plantas por fertilizante, 70 plantas por fertilizante y tipo de inóculo). Los tratamientos de fertilización diferían solo en la fuente de N utilizada. Las fuentes de N utilizadas fueron: (1) amonio (NH₄⁺); (2) nitrato (NO₃⁻); (3) N orgánico (mezcla de amino ácidos, AA); (4) N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio; NH₄⁺ + NO₃⁻); y (5) mezcla completa (mezcla equimolar de las tres fuentes de N: nitrato, amonio y N orgánico; NH₄⁺ + NO₃⁻ + AA) (Tabla 1). Además, se añadió un tratamiento sin fertilizante como control (6). En los fertilizantes, las

proporciones entre los macronutrientes se determinaron según las recomendaciones de Landis D., 1989. Además, se añadió una mezcla de micronutrientes (Nutromix, Biagro, España) en una concentración $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Se midió la conductividad y el pH de los fertilizantes con un conductímetro (CM35+, Crison, España) y un pHímetro (microPH2001, Crison, España), respectivamente.

La frecuencia de fertilización fue de dos veces por semana durante 16 semanas. En cada fertilización se aportaron 45 ml de fertilizante por planta, de forma individual con una jeringuilla, a una concentración 10 mM de N. Se realizaron 32 fertilizaciones, aportando un total de 202 mg de N planta⁻¹. Esta cantidad de N está dentro del “consumo de lujo” para *Q. ilex* (Uscola et al., 2015), es decir, por encima de lo necesario para la planta, pero sin causar toxicidad. A las plantas control se les administró únicamente agua, con la misma dosis y frecuencia que a las plantas fertilizadas. Además, un día antes de cada fertilización, se realizaron riegos a saturación, para evitar la salinización del sustrato.

Tabla 1. Compuestos (mM) para una solución de 1 mM de N en los distintos fertilizantes, así como conductividad y pH de las soluciones fertilizantes a 10mM N (media \pm error estándar, n=4).

Compuesto	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NH}_4^+ \text{ NO}_3^-$	AA	Mezcla
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,3				
NH_4Cl	0,4				
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$		0,5			
N orgánico*				1	0,33
NO_3NH_4			0,5		0,33
K_2HPO_4	0,5		0,2	0,2	0,2
KH_2PO_4		0,4			
K_2SO_4		0,3	0,3	0,3	0,3
CaHPO_4		0,1	0,3	0,3	0,3
CaCO_3	0,6		0,3	0,3	0,3
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
Conductividad	2.4 ± 0.40	2.0 ± 0.34	2.2 ± 0.28	1.5 ± 0.30	2.2 ± 0.60
pH	7.5 ± 0.10	6.3 ± 0.071	7.5 ± 0.050	7.2 ± 0.064	7.3 ± 0.057

* Naturamin-WSP (Daymsa, España), con un contenido de N del 12,8%: los amino ácidos mayoritarios son serina (15%), prolina (13%), ácido glutámico (12%), glicina (9%) ácido aspártico y leucina (8%)

Seguimiento durante el cultivo

Se seleccionaron al azar 5 alveolos de cada bandeja, para realizar un seguimiento durante todo el experimento. Se anotó la fecha de emergencia de las plántulas de los alveolos seleccionados. Desde el 13 de junio, y cada 15 días, se midió el diámetro a nivel del suelo

y la altura del tallo dominante desde nivel del suelo hasta el brote apical. Además, dos veces por semana, se evaluó el número de metida y la fase fenológica según una clave que consideraba 5 fases: 0 - brote terminal formado; 1 - inicio de la brotación; 2 - diferenciación inicial de las hojas; 3 - hojas y tallo en expansión; 4 - hojas en maduración (ver Figura 3 para más detalles) (Oliet et al., 2011).

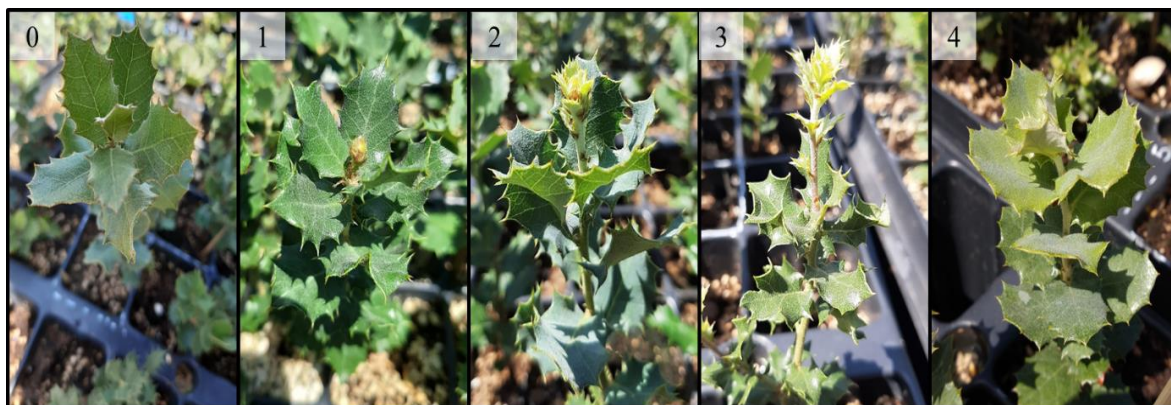


Figura 3. Fases de crecimiento de *Q. ilex* en cada metida: 0. Brote terminal formado, sin ningún indicio de crecimiento activo; 1. Brote terminal hinchado, inicio de la metida; 2. Diferenciación inicial de las hojas; 3. Hojas y tallo en expansión; y 4. Hojas totalmente expandidas en fase de maduración, elongación del tallo finalizada, brote terminal no formado.

Se realizaron 4 cosechas a lo largo del experimento cada 7-10 fertilizaciones. La primera cosecha coincidió con el final del periodo de crecimiento primaveral (18/07/2019), la segunda con la mitad del periodo de crecimiento y del periodo estival (14/08/2019), la tercera con el inicio del otoño y comienzo del periodo de endurecimiento (18/09/2019), y la última al final del periodo de crecimiento activo de las plantas (25/10/2019). Las distintas cosechas serán denominadas a partir de ahora como julio, agosto, septiembre y octubre, respectivamente. En cada una se seleccionaron al azar 3 plantas por bandeja (6 plantas por tratamiento). En las hojas maduras del tercio superior de las plantas seleccionadas, a medio día y bajo luz solar directa, se midió la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{PSII}) con un fluorímetro (FMS2, Hansatech Instruments LTD, Reino Unido) y el contenido en clorofilas con un SPAD (SPAD-502, Minolta, Japón) (Figura 4 a y b). Posteriormente, las plantas se cosecharon y se transportaron al laboratorio.

En el laboratorio, y en el mismo día de cosecha, se separó manualmente el sustrato de las raíces. Tras homogeneizar los sustrato de cada planta, aproximadamente 30 ml de

suelo, se suspendieron en agua desionizada a razón 1:5 en $V_{\text{suelo}}:V_{\text{agua}}$ y se mantuvieron en agitación intensa durante 1 hora (Ansorena, 1994). En las suspensiones se midieron la conductividad y el pH con un conductímetro (CM35+, Crison, España) y un pHímetro (microPH2001, Crison, España) respectivamente, para medir la influencia de los fertilizantes en las condiciones del suelo (Figura 4c y d).

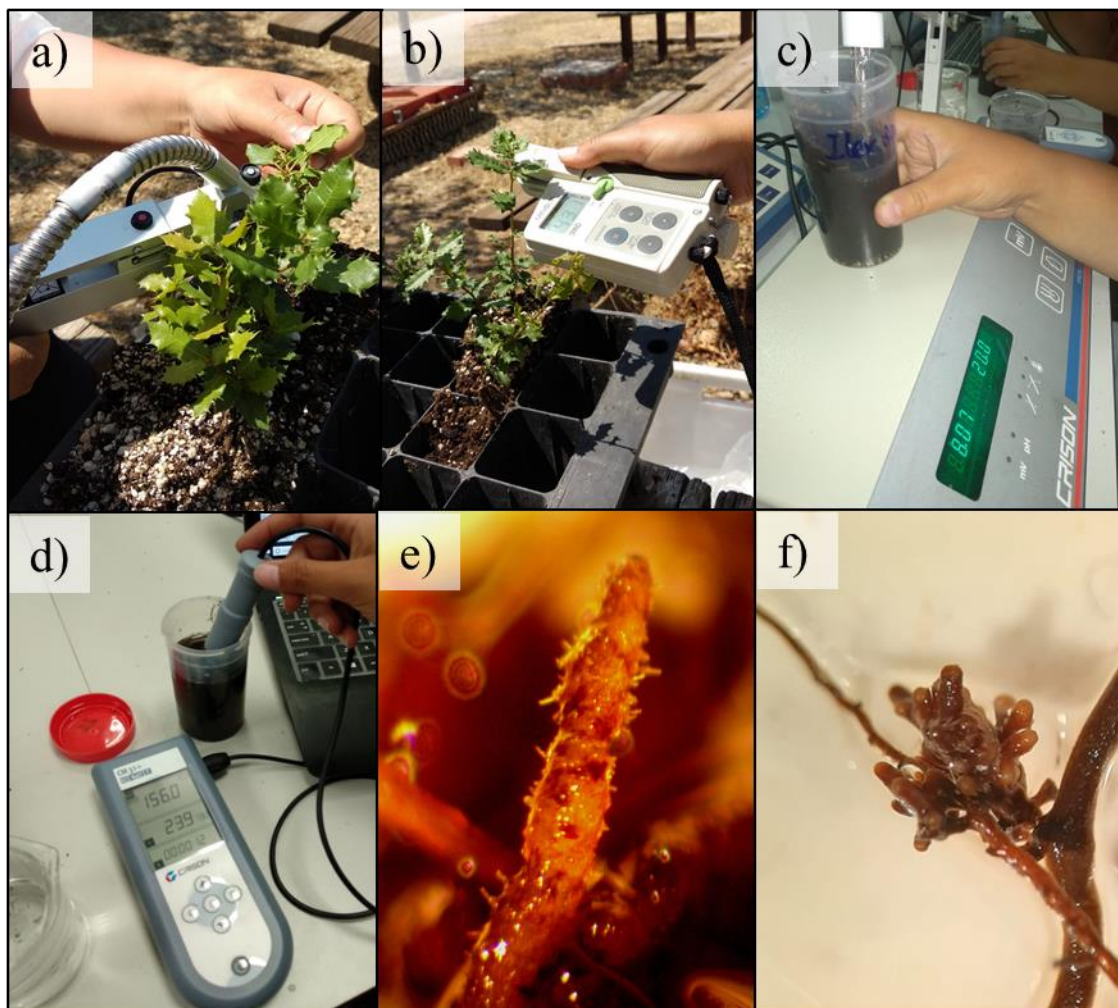


Figura 4. Análisis realizados durante las cosechas. a) medición de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m) mediante fluorímetro; b) cuantificación de clorofilas mediante SPAD; c) medición pH del extracto acuoso del suelo con pHmetro; d) medición conductividad sustrato con conductímetro; e) imágenes de las puntas observadas para la caracterización del estado de micorrización: e) punta radical sin micorrizar, con pelos radicales (microscopio óptico 40X); f) glomérulo de puntas radicales micorrizadas con *T. melanosporum* (lupa 10X).

En las plantas cosechadas, se midió el diámetro, en el punto de inserción de los cotiledones, y la altura, desde el punto de inserción de los cotiledones hasta el brote apical del tallo dominante. El cepellón se limpió cuidadosamente mediante lavados repetidos con agua. Se buscaron señales de micorrización en el sistema radical de las plantas,

mediante la observación en lupa a 10X, de puntas y glomérulos (agrupaciones de puntas radicales), para identificar puntas micorrizadas (Figura 4g y f). Aquellas puntas y/o glomérulos con indicios de micorrización se conservaron en una disolución de etanol al 70% con agua desionizada, para su posterior determinación del estado de micorrización en un microscopio óptico a 40X. Además, a cada planta se le asignó un valor de desarrollo radical, en función de la siguiente escala de elaboración propia: 0 - pocas raíces secundarias y sin terciarias; 1 - solo algunas raíces terciarias; 2 - raíces terciarias frecuentes, pero desigualmente distribuidas; 3 - abundantes raíces terciarias, glomérulos no presentes; 4 - glomérulos abundantes, pero no distribuidos homogéneamente; 5 - sistema radical bien desarrollado (ver Figura 5 para más detalles). Los valores de desarrollo radical fueron asignados por varios observadores independientes, asignándose el valor más bajo del grupo de valores propuestos. Realizadas las mediciones, los tallos se cortaron a la altura del punto de inserción de los cotiledones, y se separaron las hojas. El sistema radical se dividió en raíz gruesa (>2mm de diámetro) y raíces finas (<2mm de diámetro). Finalmente, los distintos órganos (hojas, tallo, raíz gruesa y raíces finas) se secaron en una estufa a 60 °C hasta que estabilizaron el peso y se pesaron en una balanza de precisión.

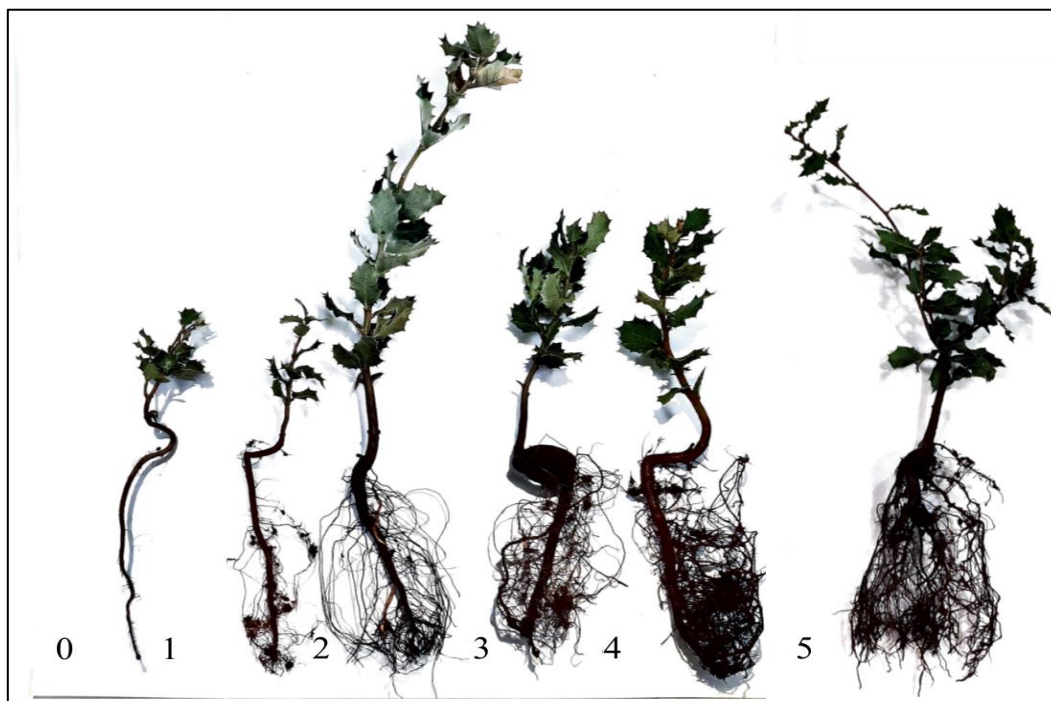


Figura 5. Niveles de desarrollo radical: 0. Sistema radical poco desarrollado, solo aparecen raíces secundarias y apenas se aprecian raíces terciarias; 1. Sistema radical poco desarrollado, secundarias desigualmente distribuidas y algunas raíces terciarias pero poco frecuentes; 2. Sistema radical poco desarrollado, raíces terciarias frecuentes pero distribuidas de manera desigual; 3. Sistema radical bien desarrollado, raíces secundarias y terciarias homogéneamente distribuidas, y aparición de glomérulos (agrupación de raíces terciarias) aislados; 4. Sistema radical bien desarrollado, gran número de raíces terciarias, glomérulos abundantes pero no distribuidos homogéneamente; 5. Sistema radical bien desarrollado, gran número de raíces terciarias, glomérulos abundantes y presentes en todo el cepellón.

Análisis estadísticos

Para analizar cada variable se realizaron distintos modelos y, se seleccionó el modelo con mejor bondad de ajuste según el valor de AIC. Para analizar el efecto de la inoculación y las fuentes de N a lo largo del tiempo en la altura, el diámetro y el volumen del tallo se realizaron distintos modelos: ANOVA de tres vías, ANCOVA considerando los días de emergencia como covariable y ANCOVA de medidas repetidas considerando el individuo como factor jerarquizado.

Para analizar el efecto de la inoculación y las fuentes de N a lo largo del tiempo en la fenología se obtuvo un número que representaba el estadio fenológico sumando el número de medida, multiplicado por diez, más el de la fase fenológica, multiplicado por dos. Posteriormente, se realizaron distintos modelos: ANOVA de tres vías, ANCOVA considerando los días de emergencia como covariable y ANCOVA de medidas repetidas considerando el individuo como factor jerarquizado.

Para analizar el efecto de las fuentes de N y la inoculación en la arquitectura radical, se realizaron dos modelos: un modelo logístico, considerando que la variable dependiente tiene una respuesta nominal y, por tanto, sigue una distribución multinomial; y un modelo lineal generalizado mixto, incorporando una función de enlace logística acumulativa, considerando que la variable dependiente sigue una distribución multinomial y que la bandeja es una variable aleatoria.

Para analizar el efecto las fuentes de N y la inoculación en el resto de variables (masa, contenido de pigmentos, ϕ_{PSII} y pH y conductividad del sustrato) se hicieron dos modelos: un ANOVA de dos vías, y un modelo lineal mixto considerando bandeja como factor aleatorio.

Previamente se comprobó la normalidad de los datos con el test de Shapiro y la homocedasticidad con el test de Levene. En caso de no verificarse la normalidad de los datos, estos fueron transformados. En caso de existir efectos significativos de los factores, se utilizó el test de diferencias significativas de Tukey para detectar diferencias entre medias, estableciendo el nivel de significancia al $\alpha = 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa R_{x64} (versión 3.5.0).

Resultados

Fenología

Se observaron diferencias en la evolución de la fenología, pero la respuesta a la fuente de N dependió de la inoculación (interacción tiempo \times fertilización \times inoculación; $F_{215,4487}=1.2$, $p=0.014$; Figura 6). Las plantas cultivadas con fertilizante orgánico e inoculadas retrasaron mucho la última metida respecto a las no inoculadas. En el caso de las plantas fertilizadas con amonio y con nitrato ocurrió lo contrario, la inoculación aceleró la fenología y las plantas alcanzaron la tercera metida mucho antes que las no inoculadas. Sin embargo, al final del periodo de crecimiento, solo existieron diferencias significativas entre plantas fertilizadas y no fertilizadas. Las plantas no fertilizadas, tanto inoculadas como no inoculadas, frenaron su crecimiento mucho antes que las plantas fertilizadas y apenas alcanzaron la tercera metida. Por el contrario, la fertilización aceleró la fenología, así, las plantas fertilizadas superaron la cuarta metida en todos los casos.

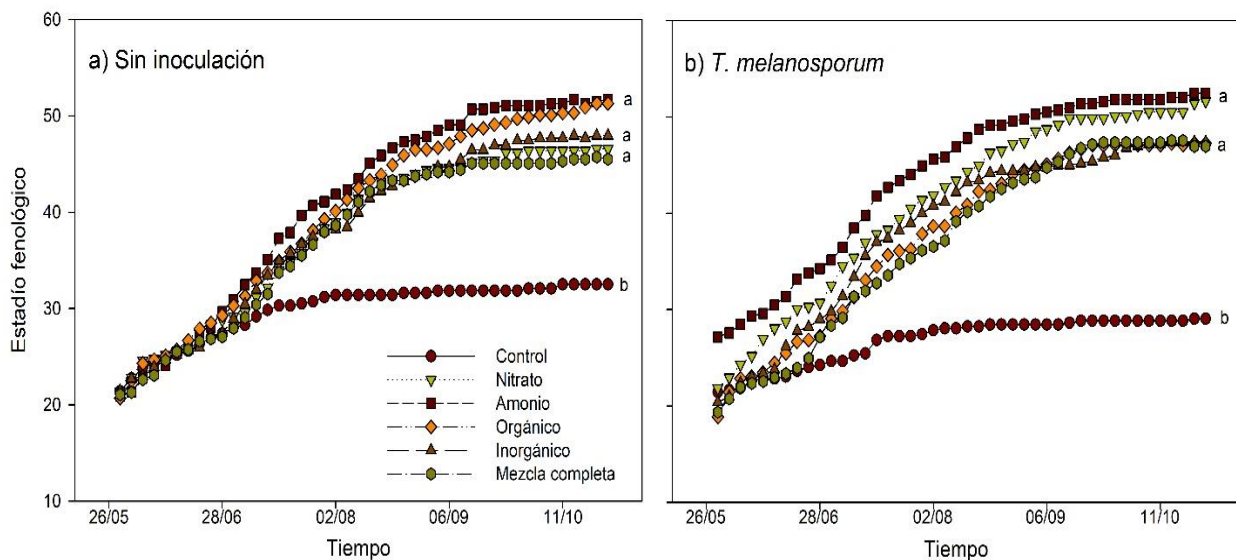


Figura 6. Estadíos fenológicos (media \pm error estándar, $n=10$) en plántulas de *Quercus ilex* sin inocular (a) e inoculadas con *Tuber melanosporum* (b), cultivadas el primer año con distintos fertilizantes a 10mM N: control (solo agua), nitrato, amonio, N orgánico, N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y mezcla completa (mezcla equimolar de nitrato, amonio y N orgánico). Las fertilizaciones se realizaron dos veces por semana con 45ml planta⁻¹ durante 16 semanas. Los valores de las medias están ajustados al valor promedio de la covariable (días de emergencia = 37 días). Distintas letras indican diferencias estadísticas en la última medición (Tukey HSD, $\alpha=0.05$). Nota: en el eje Y, las decenas indican número de metida y las unidades la fase dentro de la metida con valores 0, 2, 4, 6 y 8. Donde 0 indica brote terminal formado y sin crecimiento activo, 2 indica brote terminal engrosado, 4 indica diferenciación inicial de las hojas, 6 indica hojas y tallo en expansión apical y 8 indica hojas expandidas y en fase de maduración y tallo totalmente elongado.

Morfología durante el cultivo

La altura aumentó únicamente por el uso de fertilizante, sin diferencias entre las fuentes de N (datos no mostrados). Sin embargo, estas diferencias no aparecieron hasta 13 días después del comienzo de la fertilización y se fueron haciendo más acusadas con el tiempo, ya que las plantas control frenaron su crecimiento en altura antes que las fertilizadas (interacción tiempo \times fertilizante; $F_{45,1020}=13.9$, $p<0.001$). Las plantas fertilizadas presentaron un crecimiento rápido en altura durante los 70 días posteriores al inicio de la fertilización y, posteriormente, su crecimiento se ralentizó.

En el crecimiento en diámetro (datos no mostrados) y en el volumen del tallo (Figura 7) siguieron el mismo patrón. Las plantas no fertilizadas no mostraron diferencias en crecimiento diametral o de volumen de tallo en función de la inoculación. Sin embargo, la respuesta del crecimiento en plantas fertilizadas dependió de la inoculación (interacción tiempo \times fertilizante \times inoculación; $F_{45,1019}=1.4$, $p=0.035$; y $F_{45,1019}=1.7$; $p=0.0031$, para diámetro y volumen del tallo, respectivamente). Sin inoculación, las fuentes de N que más promovieron el crecimiento fueron la mezcla de fuentes de N inorgánicas, el N orgánico, y el amonio, mientras que el nitrato y la mezcla equimolar de todas las fuentes presentaron crecimientos intermedios sin diferencias con las plantas no fertilizadas. Cuando las plantas fueron inoculadas con *T. melanosporum* la fuente de N que más promovió el crecimiento fue el amonio, seguida por la mezcla equimolar de las tres fuentes de N, mientras que las restantes fuentes de N no presentaron diferencias con las plantas no fertilizadas. Para el crecimiento en diámetro, las diferencias con respecto a las plantas no fertilizadas se hicieron significativas a partir del día 70 tras el inicio de la fertilización, y para el volumen del tallo a partir del día 27.

Los tratamientos de fertilización e inoculación no causaron diferencias significativas en la masa de raíz gruesa, raíz fina, parte radical ni planta completa, en ninguna de las cosechas, aunque, dependiendo de la cosecha, si modificó la biomasa aérea. Cuatro semanas después de iniciada la fertilización no se detectaron diferencias en la masa de ningún órgano ni a nivel de planta entre plantas de los distintos tratamientos (Tabla 2, figura 8a). Sin embargo, el ratio PA/PR de las plantas no fertilizadas fue menor que el de las plantas fertilizadas, excepto si las plantas estaban fertilizadas con N orgánico

que no mostraron diferencias ni con los controles ni con las plantas del resto de tratamientos de fertilización.

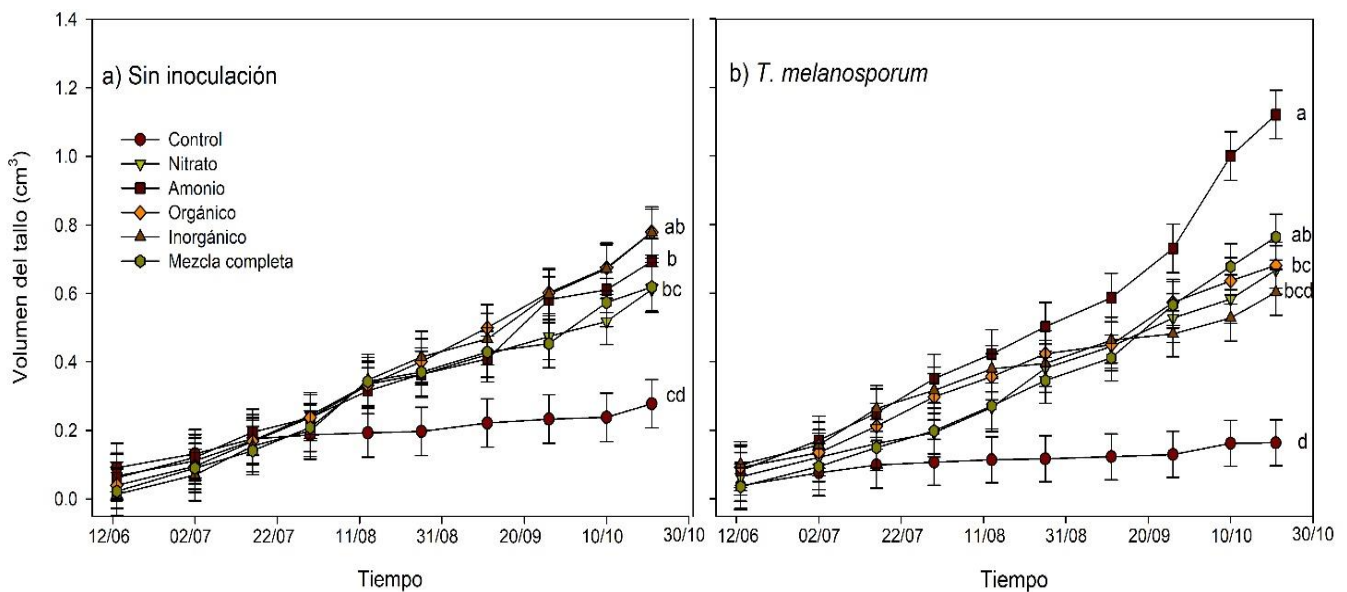


Figura 7. Volumen del tallo (media \pm error estándar, $n=10$) en plántulas de *Quercus ilex* sin inocular (a) e inoculadas con *Tuber melanosporum* (b), cultivadas el primer año con distintos fertilizantes a 10mM N: control (solo agua), nitrato, amonio, N orgánico, N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y mezcla completa (mezcla equimolar de nitrato, amonio y N orgánico). Las fertilizaciones se realizaron dos veces por semana con 45ml planta⁻¹ durante 16 semanas. Los valores de las medias están ajustados al valor promedio de la covariable (días de emergencia = 37 días). Distintas letras indican diferencias estadísticas en la última medición (Tukey HSD, $\alpha=0.05$).

En la cosecha de agosto, la masa de la parte aérea y el tallo aumentó en las plantas fertilizadas con amonio y N inorgánico respecto a las no fertilizadas que presentaron los menores valores (Tabla 2, figura 8b). Las plantas fertilizadas con nitrato, con N orgánico y con mezcla completa tuvieron una masa de tallo intermedia, sin diferencias con los extremos. Consecuentemente, la fertilización aumentó el ratio PA/PR con respecto a las plantas no fertilizadas, independientemente de la fuente de N.

En la cosecha de septiembre, la masa de las hojas y tallos, y por tanto de la parte aérea de las plantas fertilizadas fue mayor que la de las no fertilizadas, con la excepción de los tallos de las plantas fertilizadas con N orgánico que tuvieron una masa intermedia (Tabla 2, figura 8c). En esta cosecha, las plantas fertilizadas independientemente de la fuente de N tuvieron mayor ratio PA/PR que las no fertilizadas. De entre las plantas fertilizadas, las fertilizadas con mezcla completa presentaron el mayor ratio PA/PR, sin

diferencias con las fertilizadas con amonio y con N orgánico. Las plantas fertilizadas con N inorgánico y con nitrato tuvieron un ratio PA/PR menor.

En la última cosecha (octubre), la masa de las hojas, de la parte aérea, y del ratio PA/PR aumentó en las plantas fertilizadas con respecto a las no fertilizadas, independientemente de la fuente de N (Tabla 2, figura 8d). La masa del tallo también aumentó en las plantas fertilizadas respecto a las no fertilizadas, con todas las fuentes de N, excepto con nitrato, que no se diferenció de las plantas no fertilizadas ni con las plantas de los restantes tratamientos de fertilización.

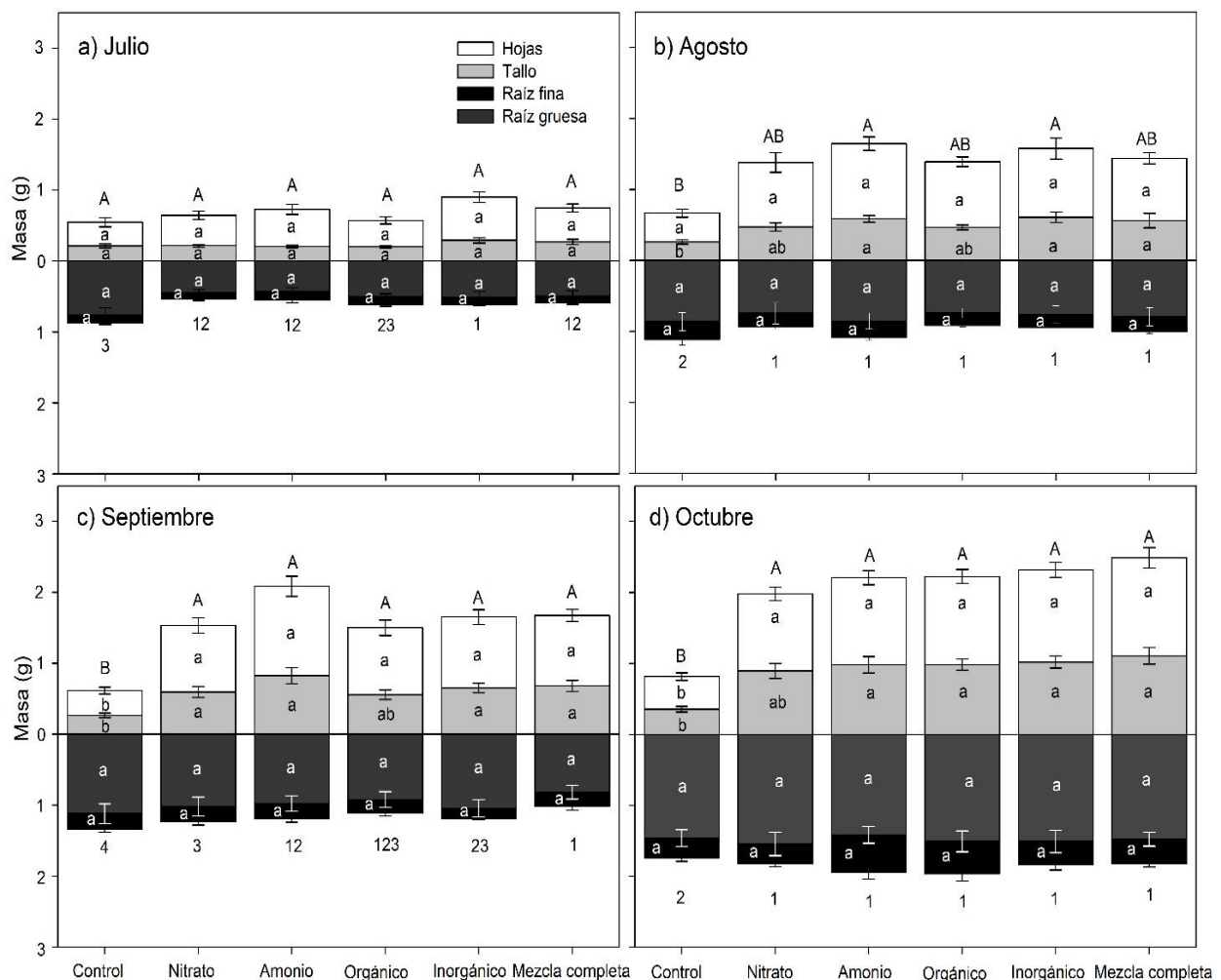


Figura 8. Masa de los distintos órganos (media \pm error estándar, $n=6$) en plantas de *Quercus ilex* en julio (a), agosto (b), septiembre (c) y octubre (d). Las plantas fueron cultivadas el primer año con distintos fertilizantes a 10mM N: control (solo agua), nitrato, amonio, N orgánico, N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y mezcla completa (mezcla equimolar de nitrato, amonio y N orgánico). Las fertilizaciones se realizaron dos veces por semana con 45ml planta⁻¹. Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas dentro del mismo órgano y cosecha. Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las partes aéreas dentro de la misma cosecha. Distintos números indican diferencias en el ratio parte aérea/ parte radical (PA/PR) dentro de la misma cosecha (Tukey HSD, $\alpha=0.05$).

Tabla 2. Valores de F y p de masa de los distintos órganos y a nivel de planta, y del ratio parte aérea parte radical (PA/PR) de los modelos lineales mixtos con bandeja como variable aleatoria en plantas de *Quercus ilex* sin inocular e inoculadas con *Tuber melanosporum*. Las plantas fueron cultivadas el primer año con distintos fertilizantes a 10mM N: control (solo agua), nitrato, amonio, N orgánico, N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y mezcla completa (mezcla equimolar de nitrato, amonio y N orgánico).

	Fertilizante	Inoculación	Fertilización×Inoculación
Julio			
Planta	F _{5,60} =0.43; p=0.83	F _{1,60} =0.48; p=0.49	F _{5,60} =0.97; p=0.44
Parte aérea	F _{5,60} =1.9; p=0.17	F _{1,60} =1.2; p=0.29	F _{5,60} =0.65; p=0.67
Hojas	F _{5,60} =2.3; p=0.11	F _{1,60} =2.4; p=0.15	F _{5,60} =0.90; p=0.51
Tallo	F _{5,60} =1.0; p=0.44	F _{1,60} =0.002; p=0.97	F _{5,60} =0.26; p=0.93
Parte radical	F _{5,60} =1.0; p=0.45	F _{1,60} =0.006; p=0.94	F _{5,60} =0.55; p=0.74
Raíz gruesa	F _{5,60} =1.3; p=0.32	F _{1,60} =0.046; p=0.83	F _{5,60} =0.28; p=0.92
Raíz fina	F _{5,60} =0.16; p=0.97	F _{1,60} =1.6; p=0.23	F _{5,60} =2.3; p=0.11
PA /PR	F_{5,60}=7.9; p<0.001	F _{1,60} =1.7; p=0.20	F _{5,60} =0.24; p=0.94
Agosto			
Planta	F _{5,60} =0.79; p=0.5	F _{1,60} =1.7; p=0.22	F _{5,60} =0.45; p=0.81
Parte aérea	F_{5,60}=3.6; p=0.032	F _{1,60} =1.9; p=0.19	F _{5,60} =0.66; p=0.66
Hojas	F _{5,60} =2.7; p=0.074	F _{1,60} =0.97; p=0.34	F _{5,60} =0.59; p=0.71
Tallo	F_{5,60}=5.7; p<0.001	F _{1,60} =3.9; p=0.054	F _{5,60} =0.76; p=0.58
Parte radical	F _{5,60} =0.22; p=0.948	F _{1,60} =1.3; p=0.27	F _{5,60} =0.49; p=0.78
Raíz gruesa	F _{5,60} =0.17; p=0.97	F _{1,60} =0.64; p=0.44	F _{5,60} =0.43; p=0.82
Raíz fina	F _{5,60} =0.29; p=0.91	F _{1,60} =3.8; p=0.076	F _{5,60} =0.92; p=0.50
PA /PR	F_{5,60}=9.0; p<0.001	F _{1,60} =0.45; p=0.50	F _{5,60} =2.04; p=0.086
Septiembre			
Planta	F _{5,60} =2.0; p=0.14	F _{1,60} =0.04; p=0.85	F _{5,60} =0.88; p=0.52
Parte aérea	F_{5,60}=8.0; p<0.001	F _{1,60} =0.002; p=0.97	F _{5,60} =0.78; p=0.57
Hojas	F_{5,60}=8.4; p<0.001	F _{1,60} =0.35; p=0.56	F _{5,60} =0.82; p=0.54
Tallo	F_{5,60}=6.6; p<0.001	F _{1,60} =0.47; p=0.51	F _{5,60} =0.91; p=0.50
Parte radical	F _{5,60} =6.3; p=0.80	F _{1,60} =0.014; p=0.91	F _{5,60} =0.83; p=0.55
Raíz gruesa	F _{5,60} =0.59; p=0.71	F _{1,60} =0.001; p=0.98	F _{5,60} =0.71; p=0.63
Raíz fina	F _{5,60} =0.25; p=0.93	F _{1,60} =0.059; p=0.81	F _{5,60} =1.5; p=0.27
PA /PR	F_{5,60}=21.1; p<0.001	F _{1,60} =0.37; p=0.54	F _{5,60} =1.8; p=0.14
Octubre			
Planta	F _{5,60} =3.0; p=0.056	F _{1,60} =1.9; p=0.19	F _{5,60} =0.53; p=0.75
Parte aérea	F_{5,60}=8.0; p<0.001	F _{1,60} =1.3; p=0.27	F _{5,60} =0.33; p=0.89
Hojas	F_{5,60}=11.9; p<0.001	F _{1,60} =0.40; p=0.54	F _{5,60} =0.62; p=0.69
Tallo	F_{5,60}=5.4; p=0.008	F _{1,60} =2.5; p=0.14	F _{5,60} =0.28; p=0.92
Parte radical	F _{5,60} =0.15; p=0.98	F _{1,60} =1.7; p=0.21	F _{5,60} =0.59; p=0.71
Raíz gruesa	F _{5,60} =0.077; p=1.0	F _{1,60} =3.0; p=0.11	F _{5,60} =0.68; p=0.65
Raíz fina	F _{5,60} =1.2; p=0.35	F _{1,60} =0.31; p=0.59	F _{5,60} =0.65; p=0.66
PA /PR	F_{5,60}=15.9; p<0.001	F _{1,60} =0.53; p=0.47	F _{5,60} =0.53; p=0.70

Desarrollo radical y grado de micorrización

El grado de desarrollo radical no mostró diferencias significativas en respuesta a la fertilización ni a la inoculación hasta la cosecha de octubre. En octubre el desarrollo radical respondió a los fertilizantes de forma distinta en función de la inoculación (interacción fertilización ×inoculación; $\chi^2_{20}=39.1$; p=0.0064; Figura 9). Las plantas con mayor desarrollo radical fueron las plantas inoculadas y fertilizadas con la mezcla

completa. Las plantas con un menor desarrollo radical fueron las plantas inoculadas y fertilizadas con N inorgánico, y las plantas no fertilizadas independientemente de la inoculación. El resto de los tratamientos tuvieron un desarrollo radical intermedio.

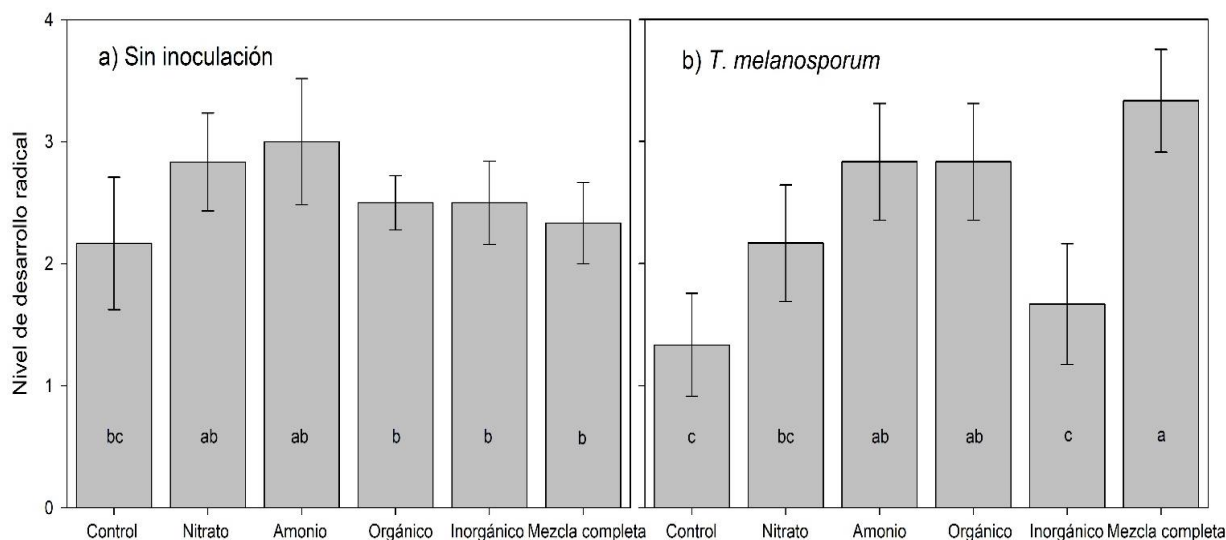


Figura 9. Nivel de desarrollo radical (media \pm error estándar, $n=6$) en plantas de *Quercus ilex* sin inocular (a) e inoculadas con *Tuber melanosporum* (b) en la cosecha de octubre. Donde el nivel de desarrollo radical se corresponde con: 0. Sistema radical poco desarrollado, solo aparecen raíces secundarias y apenas se aprecian raíces terciarias; 1. Raíces secundarias desigualmente distribuidas y algunas raíces terciarias; 2. Raíces terciarias frecuentes pero distribuidas de manera desigual; 3. Raíces secundarias y terciarias homogéneamente distribuidas, y aparición de glomérulos aislados; 4. Gran número de raíces terciarias, glomérulos abundantes pero no distribuidos homogéneamente; y 5. Gran número de raíces terciarias, glomérulos abundantes y presentes en todo el cepellón. Las plantas fueron cultivadas el primer año con distintos fertilizantes a 10mM N: control (solo agua), nitrato, amonio, N orgánico, N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y mezcla completa (mezcla equimolar de nitrato, amonio y N orgánico). Las fertilizaciones se realizaron dos veces por semana con 45ml planta⁻¹. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $\alpha=0.05$).

No se encontraron indicios observables de micorrización en ninguna de las plantas, por parte de ninguna especie de hongo, independientemente del tratamiento de inoculación y de fertilización (datos no mostrados). Sin embargo, sí se encontraron ciertos cambios morfológicos que preceden a la micorrización, como la formación de glomérulos y la pérdida de pelos radicales (datos no mostrados).

Parámetros fisiológicos

El contenido de clorofilas de las hojas no tuvo respuesta a la fertilización ni a la inoculación en la cosecha de julio (Tabla 3). Sin embargo, en la cosecha de agosto, el contenido de clorofilas aumentó con la fertilización. Las plantas fertilizadas con N inorgánico y con la mezcla completa tuvieron el mayor contenido en clorofila, las plantas

no fertilizadas el menor y las plantas fertilizadas con el resto de fuentes de N, tuvieron un contenido de clorofilas intermedio sin diferencias con los extremos. En las cosechas de septiembre y octubre, el efecto sobre el contenido de clorofilas de la fertilización dependió del tipo de inoculación (interacción inoculación \times fertilización). En la cosecha de septiembre, las plantas con menor contenido en clorofila fueron las inoculadas y no fertilizadas, mientras que las que mayor contenido tuvieron fueron las plantas sin inocular y fertilizadas con N orgánico y con amonio. Las plantas con segundo mayor contenido en clorofilas fueron las no inoculadas y fertilizadas con mezcla completa y las fertilizadas con N inorgánico independientemente de la inoculación. Los tratamientos restantes tuvieron un contenido de clorofilas sin diferencias con los tratamientos anteriores. En octubre, al igual que en septiembre, las plantas con menor contenido en clorofila fueron las inoculadas y no fertilizadas. Sin embargo, el mayor contenido en clorofilas se encontró en plantas no inoculadas y fertilizadas con N orgánico y nitrato, las inoculadas y fertilizadas con N inorgánico, y las fertilizadas con mezcla completa, independientemente de la inoculación. Los tratamientos restantes tuvieron un contenido de clorofilas intermedio, sin diferencias entre ellos, ni con los tratamientos anteriores.

La ϕ_{PSII} , en la cosecha de julio, descendió un 16% en las plantas inoculadas respecto a las plantas no inoculadas (0.45 ± 0.022 y 0.52 ± 0.025 respectivamente; $F_{1,60}=4.5$; $p=0.037$) sin efecto de la fertilización ($F_{5,60}=1.0$; $p=0.4$). En las cosechas de agosto y septiembre, el efecto del fertilizante sobre la ϕ_{PSII} varió según el tipo de inoculación (interacción inoculación \times fertilización; Tabla 3). En agosto, las plantas inoculadas y no fertilizadas fueron las que presentaron la menor ϕ_{PSII} , sin embargo, en septiembre fueron las no inoculadas y no fertilizadas. En ambas cosechas las plantas inoculadas y fertilizadas con mezcla completa tuvieron el mayor ϕ_{PSII} . Los tratamientos restantes tuvieron valores de ϕ_{PSII} sin diferencias con los tratamientos anteriores. En la cosecha de octubre el efecto de la inoculación desapareció. La ϕ_{PSII} aumentó en las plantas fertilizadas respecto a las no fertilizadas. Dentro de las plantas fertilizadas, las que tuvieron una mayor ϕ_{PSII} fueron las fertilizadas con N orgánico, y las que menor las fertilizadas con nitrato. Los tratamientos de fertilización restantes tuvieron una ϕ_{PSII} intermedia.

Tabla 3. Contenido clorofilas y eficiencia máxima potencial del fotosistema II (media \pm error estándar, n= 6) de *Q. ilex* según el tratamiento de fertilización, el inóculo con *T. melanosporum* y el mes de cosecha. Se presentan las medias \pm el error estándar. Las tres últimas columnas son los valores F y p del modelo de mejor bondad de ajuste según AIC (ANOVA de dos vías o modelo lineal mixto con la bandeja como variable aleatoria). En aquellas cosechas en las que la inoculación no fue significativa los datos se presentan solo según el factor de fertilización. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada cosecha (Tukey HSD, $\alpha=0.05$).

	Control	Nitrato	Amonio	Orgánico	Inorgánico	Mezcla completa	Fertilización	Inoculación	Fertilización × Inoculación
Contenido en clorofilas									
Julio	38.1± 1.7a	40.4± 2.0a	42.7± 1.2a	40.5 ± 1.2a	44.9± 2.4a	42.5± 1.7a	F _{5,60} =1.8; p=0.14	F _{1,60} =0.28; p=0.60	F _{5,60} =0.64; p=0.67
Agosto	38.0± 1.6b	44.4± 2.5ab	45.2± 1.3ab	40.8± 1.8ab	49.7± 3.1a	46.7± 1.8a	F_{5,60}=4.1; p=0.003	F _{1,60} =0.93; p=0.34	F _{5,60} =1.3; p=0.27
Septiembre									
Sin inocular	40.5± 1.8bc	49.5± 1.8ab	50.9± 2.3a	51.4± 2.4a	44.6± 1.5abc	48.7± 1.6ab	F_{5,60}=9.4; p<0.001	F_{1,60}=6.1; p=0.016	F_{5,60}=2.4; p=0.048
T. melanosporum	38.67± 0.96c	47.75± 0.44ab	45.1± 1.5abc	46.7± 1.4abc	48.7± 1.3ab	44.8± 1.2abc			
Octubre									
Sin inocular	40.4± 2.4bc	51.2± 1.3ab	51.0± 1.3abc	52.9± 2.3a	45.0± 2.7abc	52.0± 2.4ab	F_{5,60}=8.1; p<0.001	F _{1,60} =0.25; p=0.62	F_{5,60}=2.4; p=0.048
T. melanosporum	38.9± 1.5c	47.3± 2.6abc	50.4± 1.8abc	47.4± 2.2abc	53.3± 2.7a	51.3± 2.3ab			
Eficiencia del fotosistema II									
Agosto									
Sin inocular	0.35± 0.068ab	0.38± 0.066ab	0.45± 0.066ab	0.33± 0.058ab	0.42± 0.021ab	0.28± 0.037ab	F _{5,60} =1.1; p=0.39	F _{1,60} =0.083; p=0.77	F_{5,60}=3.7; p=0.006
T. melanosporum	0.24± 0.058b	0.37± 0.035ab	0.29± 0.034ab	0.47± 0.072ab	0.39± 0.061ab	0.51± 0.062a			
Septiembre									
Sin inocular	0.28± 0.040b	0.44± .022ab	0.47± 0.033ab	0.55± 0.079ab	0.49± 0.039ab	0.36± 0.031ab	F_{5,60}=3.4; p=0.009	F _{1,60} =0.19; p=0.67	F_{5,60}=2.4; p=0.048
T. melanosporum	0.30± 0.069ab	0.51± 0.11ab	0.37± 0.031ab	0.39± 0.031ab	0.42± 0.021ab	0.55± 0.072a			
Octubre	0.23± 0.036c	0.45± 0.030b	0.50± 0.029ab	0.60± 0.025a	0.55± 0.020ab	0.53± 0.030ab	F_{5,60}=19.5; p<0.001	F _{1,60} =0.097; p=0.76	F _{5,60} =0.35; p=0.88

Características químicas en el extracto acuoso del sustrato de cultivo.

La conductividad del sustrato aumentó en las plantas fertilizadas con respecto al de las no fertilizadas en todas las fechas (Figura 10a; $F_{5,60}=41.2$, $p<0.001$; $F_{5,60}=15.9$, $p<0.001$; $F_{5,60}=8.8$, $p=0.001$; $F_{5,60}=14.5$, $p<0.001$, para julio, agosto, septiembre y octubre, respectivamente). Además, en octubre, el amonio fue el fertilizante que más aumentó la conductividad, presentando una conductividad 1.5 y 7 veces mayor que las de las plantas fertilizadas con otras fuentes de N y que las no fertilizadas, respectivamente. No hubo efecto de la inoculación en la conductividad del sustrato, salvo en la cosecha de julio, cuando la inoculación aumentó la conductividad ($F_{1,60}=11.3$, $p=0.006$ para julio; y $p>0.20$ para las demás fechas; datos no mostrados).

El pH del sustrato se acidificó en respuesta a la fertilización en todas las fechas (Figura 10b; $F_{5,60}=32.6$, $p<0.001$; $F_{5,60}=36.4$, $p<0.001$; $F_{5,60}=84.0$, $p<0.001$; $F_{5,60}=38.2$, $p<0.001$, para julio, agosto, septiembre y octubre, respectivamente). En general, el pH del sustrato de las plantas no fertilizadas fue el más básico, el de los fertilizados con amonio fue el más ácido, y el sustrato del resto de fertilizantes tuvo un pH intermedio, sin diferencias significativas entre sí. Además, en la cosecha de septiembre, el sustrato de las plantas no inoculadas fue más ácido que el de las inoculadas, excepto en las plantas no fertilizadas (interacción fertilizante \times inoculación; $F_{5,60}=2.7$, $p=0.028$; datos no mostrados).

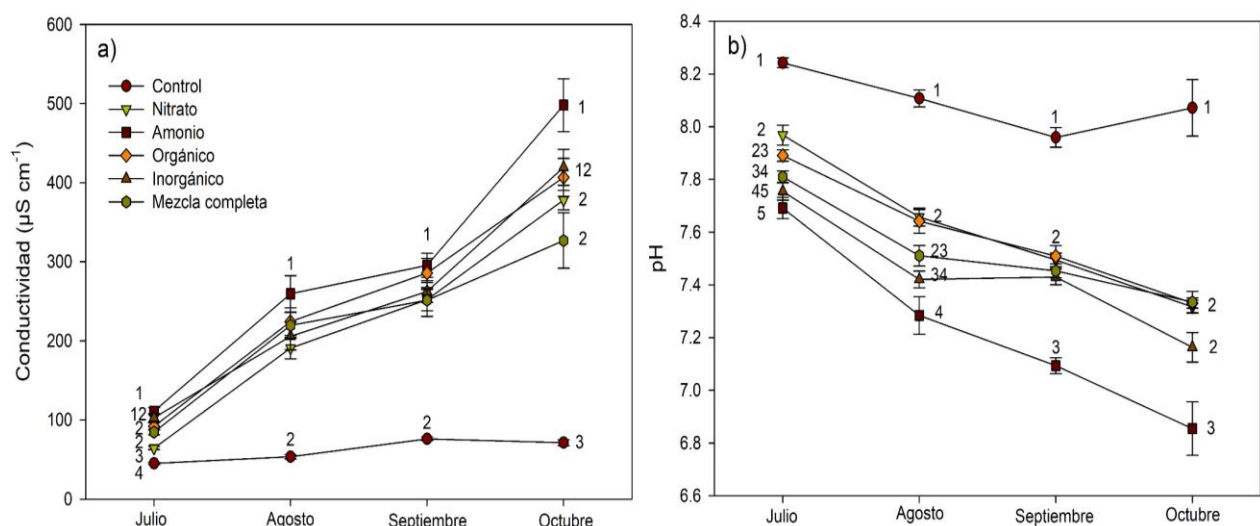


Figura 10. Conductividad (A) y pH (media \pm error estándar, $n=6$) de extracto acuoso (5:1 V:V) del sustrato de cultivo (turba + piedra caliza; 5:1 V:V) utilizado en plántulas de *Quercus ilex* cultivadas el primer año con distintos fertilizantes a 10mM N: control (solo agua), nitrato, amonio, N orgánico, N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y mezcla completa (mezcla equimolar de nitrato, amonio y N orgánico). Las fertilizaciones se realizaron dos veces por semana con 45ml planta⁻¹. Distintos números indican diferencias estadísticas dentro de cada momento de cosecha (Tukey HSD, $\alpha=0.05$).

Discusión

Efectos de la fertilización con distintas fuentes de N en la micorrización con T. melanosporum

No se encontró micorrización con *T. melanosporum* en ninguna de las plantas, estuvieran o no fertilizadas, por lo que no se ha podido comprobar nuestra hipótesis. No se puede atribuir la falta de micorrizas a la fertilización, ya que tampoco se observaron micorrizas en las plantas no fertilizadas. También se descartó que se hubiese producido un lavado de las esporas, ya que se encontraron esporas de *T. melanosporum* durante la observación de las raíces en la última cosecha. Además, tampoco se detectaron micorrizas con hongos oportunistas, típicos de vivero, como *Cenococum* sp. (Reyna et al., 2006). La ausencia de cualquier tipo de micorrización podría deberse a que no ha transcurrido el tiempo suficiente desde la inoculación con *T. melanosporum* (5 meses) para que se desarrollen las micorrizas, y/o desde el inicio del cultivo para el caso de hongos espontáneos. Las ectomicorrizas son simbiosis que requieren un tiempo prolongado para ser funcionales y ser detectadas (Brundrett et al., 1996). Por ejemplo, Domínguez Núñez et al., (2005) y García-Barreda et al., (2017) no analizan la presencia de micorrizas de *T. melanosporum* en *Q. ilex* hasta pasados 7 y 12 meses, respectivamente, después de la inoculación. Además, en la cosecha de octubre todavía se observaron raíces en crecimiento. Dado que la micorriza se establece en las puntas de las raíces terciarias (Marks y Kozłowski, 1973), que aún estaban en formación durante la última cosecha, es consistente que no hayan podido ser colonizadas por el hongo.

Las alteraciones en el pH y la conductividad derivados de la fertilización pueden ser negativos para la micorrización, aunque los efectos dependen de la especie de hongo (García-Montero et al., 2006; Taylor, 2018). El pH óptimo para el cultivo de *T. melanosporum* está entre 7.5-8.3 (Valverde-Asenjo et al., 2009; Jaillard et al., 2016). Aunque no se han encontrado valores de salinidad óptimos para *T. melanosporum*, estudios en otras especies del género *Tuber* indican que una mayor salinidad inhibe el crecimiento del micelio (Nadim et al., 2016). El amonio fue la fuente de N que más redujo el pH y más aumento la conductividad del sustrato (Chen, 2006; Taiz y Zeiger, 2006d; Uscola et al., 2013). Estos valores están por debajo de los umbrales de pH recomendados para *T. melanosporum*. Aunque las demás fuentes de N también acidificaron el sustrato, el pH final se mantuvo dentro de los valores recomendados para el cultivo de *T.*

melanosporum. Por todo ello, salvo en las plantas cultivadas con amonio, la ausencia de micorrización no puede deberse a un pH inadecuado. Sin embargo, las plantas no fertilizadas presentan el pH del sustrato más adecuado para el desarrollo de micorriza con *T. melanosporum*. Valores más adecuados de pH para el hongo podrían obtenerse con enmiendas calizas, como un aporte mayor de piedra caliza o la adicción de productos como Dolocal. De hecho, la adecuación del sustrato para *T. melanosporum* parece estar más vinculado al contenido de carbonato activo que a otros parámetros ya mencionados (García-Montero et al., 2008). Por otro lado, otras especies de *Tuber* spp. como *T. aestivum* o *T. borchii* (Zambonelli et al., 2016) con rangos más amplios de pH y salinidad podrían beneficiarse más de la fertilización y sentir menos sus efectos negativos sin la necesidad de enmiendas calizas.

Por otro lado, aunque no se hayan detectado micorrizas, hay indicios que sugieren un inicio de establecimiento de simbiosis hongo-planta. En primer lugar, se encontraron modificaciones morfológicas en las raíces que son previas a la micorrización, como la formación de glomérulos y la pérdida de pelos radicales en las puntas terciarias (Pacioni et al., 1995). Además, se encontraron efectos significativos de la inoculación en algunos de los parámetros de las plantas, lo que sugiere un efecto del hongo. En la mayoría de los casos, el efecto de la inoculación fue negativo, reducción de crecimiento y/o reducción de pigmentos, aunque dependió del tipo de fertilizante. En general, las plantas inoculadas, adelantaron su fenología, comenzaron a crecer y también pararon antes que las no inoculadas, especialmente cuando la fuente de N fue nitrato. Por el contrario, las plantas cultivadas con N orgánico presentaron una fenología más lenta. Estos efectos descritos podrían explicarse por un desvío de carbohidratos de la planta hacia el hongo, lo que se traduciría en menos recursos disponibles para las plantas y en la merma de su rendimiento durante el establecimiento de la micorriza (Nylund y Wallander, 1989; Le Tacon et al., 2013).

Si bien no se desarrollaron micorrizas durante el periodo analizado, las fuentes de N unidas a la inoculación promovieron ciertos atributos en las plantas que podrían favorecer el desarrollo de futuras micorrizas. En primer lugar, las plantas inoculadas y fertilizadas con mezcla completa, aunque no difirieron en masa radical con las plantas del resto de tratamientos, fueron las que mayor desarrollo radical tuvieron, lo que implica una mayor presencia de raíces terciarias y de glomérulos. Dichas estructuras son necesarias

para el establecimiento de la micorriza, por lo que las plantas de este tratamiento presentan una estructura radical más adecuada para la micorrización. En segundo lugar, el hongo simbionte requiere de la transferencia de carbohidratos desde la planta huésped (Nylund y Wallander, 1989; Le Tacon et al., 2013). Dado que el contenido de carbohidratos está directamente relacionado con el contenido en clorofilas y con la Φ_{PSII} (Salsac, 1987; Taiz y Zeiger, 2006c), valores máximos de ambos parámetros son deseables para la micorrización. La fuente de N que en inoculación optimizó ambos parámetros fue la mezcla completa. Por todo ello, los resultados sugieren que la mezcla completa podría maximizar la micorrización. Sin embargo, sería conveniente analizar el contenido de azúcares solubles en las plantas de los distintos tratamientos de fertilización.

Efectos de la fertilización con distintas fuentes de N en la calidad de planta

Las plantas fertilizadas tuvieron mayor calidad de planta que las no fertilizadas, es decir, tuvieron mayor crecimiento, así como mayores Φ_{PSII} y contenido de clorofilas. Es sabido que una mayor fertilización, sin llegar a niveles tóxicos, se traduce en una mejor calidad de planta que, finalmente, favorece una mayor supervivencia y crecimiento en campo (Oliet et al., 2009; Villar-Salvador et al., 2012). Además, la fertilización aceleró la fenología de las plantas, que completaron hasta cinco metidas, alargaron el periodo de crecimiento y redujeron el tiempo de parada entre metidas. Sin embargo, las diferencias en el desarrollo de las plantas asociadas a las fuentes de N fueron muy pequeñas. *Quercus ilex* es una especie con baja plasticidad en respuesta a los factores externos y, en especial, a la disponibilidad de nutrientes (Zavala et al., 2000; Uscola et al., 2013). Esta baja plasticidad explicaría la baja respuesta a las fuentes de N en los fertilizantes. Además, en otras especies, mientras que la respuesta a la dosis de N suele ser alta, la respuesta a las fuentes de N suele ser modesta (Gruffman et al., 2012; Uscola et al., 2013). Por ejemplo, en coníferas, si bien la respuesta morfológica a las fuentes de N es muy pequeña, las fuentes de N condicionan diferencias fisiológicas que pueden favorecer la tolerancia a factores de estrés como la sequía o el frío (Sigala et al., 2019).

La fuente de N que menos promovió el desarrollo de las plantas fue el nitrato. Las plantas fertilizadas con nitrato presentaron un menor crecimiento, con menor diámetro, y menor volumen y masa de tallo, que las plantas cultivadas con las restantes fuentes de N. En *Q. ilex* la fuente de N con menor tasa de absorción es el nitrato (Uscola et al., 2017). Además, la síntesis de proteínas a partir de nitrato tiene un elevado coste metabólico en

términos de energía y C (Salsac, 1987; Raven et al., 1992). La menor capacidad de adquisición de N y el mayor coste metabólico se traducirían en una menor capacidad de crecimiento. Por otro lado, los parámetros fisiológicos medidos también fueron inferiores en las plantas cultivadas con nitrato, como el contenido de clorofilas y la Φ_{PSII} . Ambos parámetros están relacionados con la capacidad fotosintética y, por tanto, de producción de carbohidratos (Taiz y Zeiger, 2006b). Estos resultados sugieren que la capacidad fotosintética de las plantas cultivadas con nitrato es inferior a las plantas cultivadas con otras fuentes de N, lo que explicaría su menor crecimiento.

La fuente de N que más promovió el crecimiento fue el amonio, aunque el efecto fue solo detectado a nivel de altura y ligeramente a nivel de volumen de tallo y diámetro, pero no a nivel de masa. *Quercus ilex* tiene una elevada tasa de absorción de amonio en comparación al nitrato (Uscola et al., 2017). Además, la síntesis de proteínas a partir de amonio tiene menor coste metabólico, en términos de energía y C, que a partir de nitrato (Salsac, 1987; Taiz y Zeiger, 2006a). Todo ello justificaría el mayor crecimiento de las plantas cultivadas con amonio. A pesar de aumentar el crecimiento, la fertilización con amonio no favoreció el contenido de clorofilas tanto como lo hicieron otras fuentes de N, siendo este incluso inferior al de las cultivadas con nitrato. Por otro lado, Uscola et al., (2013) describieron efectos de toxicidad en plantas de *Q. ilex* fertilizadas con amonio como fuente de N exclusiva, utilizando la misma concentración que la de este experimento, 10 mM N. La ausencia de efectos tóxicos en este trabajo se debió, probablemente, a que las condiciones de cultivo fueron similares a las de un cultivo de vivero convencional, que incluyen la realización de riegos entre fertilizaciones y que no se hicieron en el trabajo de Uscola et al., (2013). Estos riegos intermedios contribuirían a aliviar los efectos tóxicos del amonio, reduciendo así su acumulación en el sustrato. En nuestro experimento, los valores de conductividad del sustrato en el tratamiento de amonio fueron de $500 \mu\text{S cm}^{-1}$ (en extracto acuoso a factor 5 de dilución), mientras que los encontrados en Uscola et al., (2013) fueron superiores a $3000 \mu\text{S cm}^{-1}$ (en extractos saturados). Esto apoyaría la idea de una menor salinidad en nuestro experimento. Además, *Quercus ilex* tiene un valor máximo de tolerancia a la salinidad de $3000 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Miyamoto et al., 2004). Mientras que en este experimento la conductividad está por debajo de este umbral, los resultados de Uscola et al., (2013) se encuentran en el límite de tolerancia a la salinidad de la especie.

Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se analiza el efecto de las fuentes de N orgánico como fuente de N exclusiva en el cultivo de *Q. ilex*. Los resultados de este estudio indican que las plantas fertilizadas con N orgánico presentaron un desarrollo optimizado con respecto a las fuentes de N inorgánicas aplicadas de forma independiente y a las mezclas convencionales, utilizadas en los viveros. La fertilización con N orgánico causó un crecimiento muy similar al amonio y a la mezcla de fuentes de N inorgánicas, pero superior al nitrato. Se ha demostrado que *Q. ilex* muestra una tasa de absorción de aminoácidos equivalente a la del amonio y superior a la de nitrato (Uscola et al., 2017). Además, de entre todas las fuentes de N, los aminoácidos son la fuente con menor coste energético para la síntesis de proteínas y, al tener un esqueleto carbonado, su absorción conlleva un aporte extra de C (Franklin et al., 2017). Sin embargo, estas ventajas no se tradujeron en un mayor crecimiento, pero sí en una mejora de los parámetros fisiológicos. Las plantas cultivadas con N orgánico tuvieron el mayor contenido en clorofilas y su Φ_{PSII} fue superior al de las plantas fertilizadas con las restantes fuentes de N. Tener una alta Φ_{PSII} , unido al alto contenido en clorofilas, puede traducirse en un mejor estado nutricional de las plantas, que sería beneficioso para su establecimiento y desarrollo en campo (Oliet et al., 2009; Villar-Salvador et al., 2012). Por ello, el N orgánico es una buena alternativa a las fuentes de N inorgánicas y presenta la ventaja añadida de poder recibir el sello de cultivo ecológico y subvenciones relativas (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2018).

Los fertilizantes convencionales, que usan una mezcla de amonio y de nitrato, mostraron una respuesta intermedia, tanto en crecimiento como en los parámetros fisiológicos, a la de las fuentes de N inorgánicas aplicadas de forma individual. Igualmente, las plantas cultivadas con mezcla completa tuvieron un desarrollo intermedio al resto de las fuentes de N individuales. Esto puede deberse al efecto conjunto de las fuentes. Al presentarse las fuentes de N de forma conjunta los efectos negativos de cada fuente de N se compensan (Landis D., 1989; Taiz y Zeiger, 2006d). Por ello, las plantas cultivadas con mezcla de fuentes de N inorgánicas presentaron un crecimiento superior a las de nitrato, pero inferior a las de amonio, aunque con valores de clorofila superiores a las plantas cultivadas con amonio. De la misma forma, las plantas cultivadas con mezcla completa presentaron crecimiento similar al de las plantas cultivadas con las fuentes de N individuales, pero maximizaron su contenido de clorofilas respecto al resto de fuentes de N, a excepción de los encontrados en las plantas cultivadas con N orgánico que fueron

similares. Sin embargo, esta mejora no fue suficiente para aumentar la Φ_{PSII} hasta el nivel de las plantas cultivadas con N orgánico.

Por último, las fuentes de N presentaron distintos patrones fenológicos. Las plantas fertilizadas con amonio y con N inorgánico tuvieron periodos de parada más largos, mientras que las plantas fertilizadas con N orgánico presentaron un crecimiento más continuo. Los periodos de parada funcionarían como periodo de recarga de reservas previo a la iniciación de un nuevo periodo de crecimiento. Un menor tiempo de parada estaría asociado a una menor dependencia de recarga de reservas, que a su vez, estaría asociada al mayor contenido en pigmentos y a una mejora de la eficiencia fotosintética en las plantas cultivadas con N orgánico (Fleischer, 1934; Taiz y Zeiger, 2006b).

Distintas especies tienen distinta respuesta a las fuentes de N. Mientras especies como *Oxyria digyna* presentan un mejor desarrollo al ser cultivadas con nitrato (Atkin y Cummins, 1994), otras especies como *Picea sitchensis* y *Pseudotsuga menziesii* se desarrollan mejor con amonio (Metcalf et al., 2011), o con N orgánico como *P. halepensis* (Sigala et al., 2019) y otras como *Pinus sylvestris* y *Picea abies* si son cultivadas con una mezcla de fuentes de N (Öhlund y Näsholm, 2001). Los resultados demuestran que *Q. ilex* presenta un desarrollo optimizado cuando es cultivada con N orgánico, en concordancia con nuestra hipótesis. La respuesta optimizada de *Q. ilex* cultivada con N orgánico podría estar asociada a una adaptación a la fuente de N dominante en su hábitat natural (Bonilla y Rodà, 1992; Delgado-Baquerizo et al., 2011) y está en concordancia con su patrón de preferencias entre fuentes de N (Uscola et al., 2017).

Siguientes pasos y futuras investigaciones

Este experimento está enclavado dentro de un proyecto mayor, que analiza el efecto de las fuentes de N, pero que, además de *Q. ilex*, incluye *Q. faginea* y micorrizados con *T. aestivum*, además de con *T. melanosporum*.

Debido a la falta de observación de micorrizas, está programada una cosecha a los nueve meses desde la inoculación (febrero de 2020). En esta cosecha se volverán a analizar todos los parámetros y se buscarán indicios de micorrización, tanto de los hongos inoculados como de posibles hongos contaminantes. Además, tanto en las plantas ya

cosechadas como en las futuras cosechas, se analizarán los contenidos de nutrientes (N, P y K así como carbohidratos no estructurales), la concentración de pigmentos por métodos químicos, que nos permitirán identificar distintos tipos de pigmentos, y otras variables indicadoras de estrés en plantas, como la prolina.

Futuras investigaciones, deberían testar la tolerancia a diferentes factores de estrés, como temperatura o sequía, para ver la actuación de las plantas de este experimento ante distintos escenarios de cambio climático. Igualmente, convendría testar qué tratamientos tienen un mayor éxito de establecimiento en una reforestación y la capacidad de mantener las micorrizas de vivero una vez trasplantadas en campo. También debería llevarse a cabo este experimento con diferentes especies típicamente utilizadas en restauración, como *P. halepensis* y con otras especies de hongo con interés comercial como *T. borchii*, con el fin de testar si los resultados obtenidos son extrapolables a un mayor número de especies vegetales.

Conclusiones

La fertilización aumentó la calidad de planta, ya que incrementó el crecimiento y favoreció parámetros fisiológicos relacionados con la capacidad fotosintética. Dentro de las fuentes de N, destaca el N orgánico como la más adecuada para el cultivo de *Q. ilex*, debido a que optimiza la fisiología de las plantas sin reducir el crecimiento. El nitrato fue la fuente de N menos adecuada, ya que no estimuló tanto el crecimiento de las plantas y ni su eficiencia fotosintética (Φ_{PSII}). No se pudo ver el efecto de las fuentes de N sobre la micorrización, ya que no se encontraron evidencias visuales de micorrizas, probablemente porque el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la última cosecha no fue suficiente para su desarrollo. Sin embargo, se encontraron efectos de la inoculación que sugieren un inicio del establecimiento de la simbiosis. La fuente de N que unida a la inoculación, dio lugar a las mejores características de planta para el establecimiento de la micorrización fue la mezcla completa. Las plantas cultivadas con mezcla completa tuvieron un mayor desarrollo radical y mejores parámetros fisiológicos. Debido a la ausencia de micorrización, se ha determinado la necesidad de hacer una cosecha más tardía en la que se midan los mismos parámetros analizados hasta ahora, y además se incluya el estado nutricional de las plantas y otros indicadores de calidad.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá y al Real Jardín Botánico Juan Carlos I, por prestarme sus instalaciones para llevar a cabo este experimento. Este experimento se ha financiado a través de la “Acción financiada por la Comunidad de Madrid en el marco del Convenio Plurianual con la Universidad de Alcalá en la línea de actuación “Programa de Estímulo a la Investigación de Jóvenes Investigadores” ” asignada al proyecto TuberRest (CM/JIN/2019-002).

Muchas gracias a todo el equipo de trabajo que me ha ayudado durante las fertilizaciones y las cosechas, además de ser un gran apoyo moral: María Rinaudo, Xia Lei, Jaime García, Karen Báez y Gabriela Godoy. Además, me gustaría agradecer a Luis Benito Matías por su ayuda y asesoramiento durante el experimento. Por último, quiero agradecer a mi directora, Mercedes Uscola, por enseñarme, guiarme, ayudarme e inspirarme.

Bibliografía

- Ansorena, J. 1994. Sustratos. Propiedades y caracterización. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Atkin, O.K., Cummins, W.R. 1994. The effect of nitrogen source on growth, nitrogen economy and respiration of two high arctic plant species differing in relative growth rate. *Functional Ecology* 8: 389.
- Aumeeruddy-Thomas, Y., Taschen, E., Richard, F. 2016. Taming the Black Truffle (*Tuber melanosporum*). Safeguarding Mediterranean food and ecological webs. En *The Mediterranean Region Under Climate Change. A Scientific Update*, pp. 533-542. IRD Éditions, Marseille.
- Benayas, J.M.R., Camacho, A. 2004. *Quercus* afforestations in abandoned Mediterranean cropland. *Sociedad Española de Ciencias Forestales* 17: 227-231.
- Bergero, R., Perotto, S., Girlanda, M., Vidano, G., Luppi, A.M. 2000. Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology* 9: 1639-1649.
- Blanco, E., Casado, M.A., Costa, M., Escribano, R., García, M., Génova, M., Gómez, F. et al. 1998. Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica. Editorial Planeta S. A., Barcelona.
- Bonet, J.A., Fischer, C.R., Colinas, C. 2006. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. *Agronomie* 26: 69-76.
- Bonilla, D., Rodà, F. 1992. Soil nitrogen dynamics in a holm oak forest. *Vegetatio* 99-100: 247-257.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol* 159: 567-584.

- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N. 1996. Pure culture isolation of fungi and the production of inoculum. En *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*, pp. 217-254. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Cartié, G., Palazón, C., Delgado, I., Barriuso, J.J. 2001. Influencia del método de inoculación, del tipo de sustrato y de la procedencia de la trufa, en la micorrización de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt. y en la supervivencia de las plantas. En *V Congrès International Science et Culture de la Truffe*, pp. 296-299. Fédération Française des Trufficulteurs, Marseille, France.
- Ceruti, A., Fontan, A., Nosenzo, C. 2003. Le specie europea del genere *Tuber*. Una revision storica. Museo Regionale di Scienze naturali. Torino.
- Chen, J.-H. 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. *International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rizhosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use* 16: 1-11.
- Chirino, E., Vilagrosa, A., Cortina, J., Valdecantos, A., Fuentes, D., Trubat, R., Luis, V.C. et al. 2009. Ecological restoration in degraded drylands: the need to improve the seedling quality and site conditions in the field. En *Forest Management*, pp. 85-158.
- Cortina, J., Amat, B., Castillo, V., Fuentes, D., Maestre, F.T., Padilla, F.M., Rojo, L. 2011. The restoration of vegetation cover in the semi-arid Iberian southeast. *Journal of Arid Environments* 75: 1377-1384.
- Cortina, J., Bellot, J., Vilagrosa, A., Caturla, R., Maestre, F., Rubio, E., Ortiz de Urbina, J., Bonet, A. 2004. Restauración en semiarido. *Avances en el estudio de la gestión del monte Mediterráneo* 121: 345-406.
- Cortina, J., Vilagrosa, A., Trubat, R. 2013. The role of nutrients for improving seedling quality in drylands. *New Forest* 44: 719-732.
- Delgado-Baquerizo, M., Covelo, F., Gallardo, A. 2011. Dissolved organic nitrogen in Mediterranean ecosystems. *Pedosphere* 21: 309-318.
- Díaz, G., Carrillo, C., Honrubia, M. 2009. Production of *Pinus halepensis* seedlings inoculated with the edible fungus *Lactarius deliciosus* under nursery conditions. *New Forests* 38: 215-227.
- Domínguez Núñez, J.A., Rodríguez Barreal, J.A., De, J.A.S., Pato, O.U.D. 2005. Ectomicorizas en dos plantaciones trufas de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) en Castellón.
- Domínguez Núñez, J.A., Serrano, J.S., Barreal, J.A.R., González, J.A.S. de O. 2006. The influence of mycorrhization with *Tuber melanosporum* in the afforestation of a Mediterranean site with *Quercus ilex* and *Quercus faginea*. *Forest Ecology and Management* 231: 226-233.
- Evans, H.J., Sorger, G.J. 1966. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annual Review of Plant Physiology* 17: 47-76.
- Fischer, C.R., Suz, L.M., Colinas, C., Bonet, J.A., Martín, M.P. 2009. Can NPK fertilizers enhance seedling growth and mycorrhizal status of *Tuber melanosporum*-inoculated *Quercus ilex* seedlings? *Mycorrhiza* 20: 349-360.
- Fleischer, W.E. 1934. The relation between chlorophyll content and rate of photosynthesis. *The journal of general physiology* 573-597.
- Franklin, O., Cambui, C.A., Gruffman, L., Palmroth, S., Oren, R., Näsholm, T. 2017. The carbon bonus of organic nitrogen enhances nitrogen use efficiency of plants. *Plant Cell and Environment* 40: 25-35.

- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.A.N.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J. 2003. The nitrogen cascade. *BioScience* 53: 341-356.
- García-Barreda, S., Molina-Grau, S., Reyna, S. 2017. Fertilization of *Quercus* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*: Effects on growth and mycorrhization of two host species and two inoculation methods. *IForest* 10: 267-272.
- García-Montero, L.G., Casermeiro B, M.A., Hernando, J., Hernando, I. 2006. Soil factors that influence the fruiting of *Tuber melanosporum* (black truffle). *Australian Journal of Soil Research* 44: 731-738.
- García-Montero, L.G., Díaz, P., Martín-Fernández, S., Casermeiro, M.A. 2008. Soil factors that favour the production of *Tuber melanosporum* carpophores over other truffle species: A multivariate statistical approach. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* 58: 322-329.
- Giorgi, F., Lionello, P. 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and planetary change* 63: 90-104.
- De Groot, R.S., Blignaut, J., Van Der Ploeg, S., Aronson, J., Elmqvist, T., Farley, J. 2013. Benefits of investing in ecosystem restoration. *Conservation Biology* 27: 1286-1293.
- Gruffman, L., Ishida, T., Nordin, A., Näsholm, T. 2012. Cultivation of Norway spruce and Scots pine on organic nitrogen improves seedling morphology and field performance. *Forest Ecology and Management* 276: 118-124.
- Hatch, A.B. 1937. The physical basis of mycotrophy in *Pinus*. *Black Rock Forest Bull.* 6: 1-168.
- Jacobs, D.F., Landis, T.D. 2009. Hardening. En Dumroese, R. K., Luna, T., Landis, T. D. (eds.), *Nursery manual for native plants: A guide for tribal nurseries - Volume 1: Nursery management. Agriculture Handbook 730*, pp. 217-227. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington DC, US.
- Jaillard, B., Oliach, D., Sourzat, P., Colinas, C. 2016. Soil characteristics of *Tuber melanosporum* habitat. En Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. (eds.), *True Truffle (Tuber spp.) in the World: Soil Ecology, systematics and biochemistry*, pp. 169-190. Springer, Switzerland.
- Kielland, K., Mcfarland, Æ.J., Olson, Æ.K. 2006. Amino acid uptake in deciduous and coniferous taiga ecosystems. *Plant Soil* 288: 297-307.
- Landis D., T. 1989. Seedling nutrition and irrigation. En *The Container Tree Nursery Manual*, pp. 1-67. Washington DC, US.
- Landis, T., Tinus, R., McDonald, A.J.S., Barnett, J.P. 1989. Mineral nutrients and fertilization. En Landis, T. D., Tinus, R. W., McDonald, S. E., Barnett, J. P. (eds.), *The Container Tree Nursery Manual. Vol. 4. Seedling nutrition and irrigation*, pp. 67. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC.
- LeBauer, D.S., Treseder, K.K. 2008. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89: 371-379.
- Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R., Alpert, P., Artale, V., Li, L., Luterbacher, J. et al. 2006. The Mediterranean climate: An overview of the main characteristics and issues. *Developments in Earth and Environmental Sciences* 4: 1-26.
- Marks, G.C., Kozlowski, T.T. 1973. *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*. Academic Press Inc, New York and London.

- Martínez De Aragón, J., Fischer, C., José, •, Bonet, A., Olivera, A., Oliach, D., Colinas, C. et al. 2012. Economically profitable post fire restoration with black truffle (*Tuber melanosporum*) producing plantations. *New Forests* 43: 615-630.
- Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H., Appel, T. 2001. Nitrogen. En *Principles of plant nutrition*, pp. 397-434. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Metcalfe, R.J., Nault, J., Hawkins, B.J. 2011. Adaptations to nitrogen form: comparing inorganic nitrogen and amino acid availability and uptake by four temperate forest plants. *Can. J. For. Res.* 41: 1626-1637.
- Millenium ecosystem assessment. 2005. *Ecosystems and human well-being: synthesis*. Island Press, Washington DC, US.
- Miyamoto, S., Martinez, I., Padilla, M., Portillo, A., Ornelas, D. 2004. Landscape plant lists for salt tolerance assessment.
- Nadim, M., Saidi, N., Hasani, I., El, M., Assad, H. 2016. Effects of some environmental parameters on mycelia growth of finnish truffle *Tuber Maculatum*. *International Journal of Engineering and Applied Sciences* 3: 1-5.
- Nardini, A., Salleo, S., Tyree, M.T., Vertovec, M. 2000. Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. *Ann. For. Sci.* 57: 305-312.
- Näsholm, T., Kielland, K., Ganeteg, U. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182: 31-48.
- Nylund, J., Wallander, H. 1989. Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. *New Phytologist* 112: 389-398.
- Öhlund, J., Näsholm, T. 2001. Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. *Tree Physiology* 21: 1319-1326.
- Oliet, J.A., Planelles, R., Artero, F., Valverde, R., Jacobs, D.F., Segura, M.L. 2009. Field performance of *Pinus halepensis* planted in Mediterranean arid conditions: relative influence of seedling morphology and mineral nutrition. *New Forests* 37: 313-331.
- Oliet, J.A., Salazar, J.M., Villar, R., Robredo, E., Valladares, F. 2011. Fall fertilization of holm oak affects N and P dynamics, root growth potential, and post-planting phenology and growth. *Annals of Forest Science* 68: 647-656.
- Pacioni, G., Ragnelli, A.M., Miranda, M. 1995. Truffle Development and Interactions with the Biotic Environment. En *Biotechnology of Ectomycorrhizae*, pp. 213-227. Springer US.
- Palmer A., M., Filoso, S. 2009. Restoration of Ecosystem Services for Environmental Markets. *Science* 325: 575-577.
- Parlamento Europeo, Consejo de la Unión Europea. 2018. Reglamento (UE) 2018/ del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) n.o 834/2007 del Consejo.
- Paungfoo-Lonhienne, C., A Lonhienne, T.G., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R.I., Gamage, H.K. et al. 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *PNAS* 105: 4524-4529.

- Pera, J., Parladé, J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Invest Agrar: Sist Recur For* 14: 419-433.
- Raven, J.A., Smith, F.A. 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist* 76: 415-431.
- Raven, J.A., Wollenwebber, B., Handley, L.L. 1992. A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. *New Phytologist* 121: 19-32.
- Rey Benayas, J.M., Newton, A.C., Diaz, A., Bullock, J.M. 2009. Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: A meta-analysis. *Science* 325: 1121-1124.
- Reyna, S., Barreda, S.G., Folch, L. 2006. Influencia del uso del suelo sobre el potencial de inóculo ectomicorrícico y la competitividad de las ectomicorizas de *Tuber melanosporum*: evaluación mediante bioensayos en invernadero *. *Invest Agrar: Sist Recur For* 15: 308-320.
- Reyna, S., Garcia-Barreda, S. 2014. Black truffle cultivation: a global reality. *Forest Systems* 23: 317-328.
- Richard, F., Millot, S., Gardes, M., Selosse, M.-A. 2005. Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* 166: 1011-1023.
- Rodà, F., Retana, J., Gracia, C.A., Bellot, J. 1999. Ecology of Mediterranean evergreen oak forests. *Serie ecological studies*. Springer Science and Business media, Berlín.
- Ruthrof, K.X., Renton, M., Dixon, K. 2013. Overcoming restoration thresholds and increasing revegetation success for a range of canopy species in a degraded urban Mediterranean-type woodland ecosystem. *Australian Journal of Botany* 61: 139-147.
- Salsac, L. 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 805-812.
- Samils, N., Olivera, A., Danell, E., Alexander, S.J., Colinas, C. 2003. Aportación de la truficultura al desarrollo socioeconómico. *Vida rural* 181.
- Samils, N., Olivera, A., Danell, E., Alexander, S.J., Fischer, C., Colinas, C. 2008. The socioeconomic impact of truffle cultivation in rural Spain. *Economic Botany* 62: 331-340.
- Sigala, J.A., Uscola, M., Oliet, J.A. 2019. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales. El papel del nitrógeno orgánico en el desarrollo en especies del género *Pinus*: resultados preliminares. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 45: 71-86.
- Le Tacon, F., Zeller, B., Plain, C., Hossann, C., Bré Chet, C., Robin, C. 2013. Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ¹³C pulse-labeling technique. *PLoS ONE* 8: 1-9.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006a. Asimilación de nutrientes minerales. En *Fisiología Vegetal Volumen I*, pp. 485-527. Universitat Jaume I, Castelló de la Plana.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006b. *Fisiología Vegetal Volumen 1*. En *Fisiología Vegetal*, Universitat Jaume I, Castelló de la Plana.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006c. *Fisiología Vegetal Volumen 2*. En *Fisiología vegetal*, Universitat Jaume I, Castelló de la Plana.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006d. Nutrición mineral. En *Fisiología Vegetal*, pp. 117-457. Universitat Jaume I, Castelló de la Plana.

- Taylor, O. 2018. The competitive relationship of the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum* with Common Native Mid-Atlantic Ectomycorrhizal Fungi. George Mason University.
- Tibbett, M., Sanders, F.E. 2002. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany* 89: 783-789.
- Treseder, K.K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist* 164: 347-355.
- Uscola, M., Oliet, J.A., Villar-Salvador, P., Díaz-Pinés, E., Jacobs, D.F. 2013. Nitrogen form and concentration interact to affect the performance of two ecologically distinct Mediterranean forest trees. *European Journal of Forest Research* 133: 235-246.
- Uscola, M., Salifu, K.F., Oliet, J.A., Jacobs, D.F. 2015. An exponential fertilization dose-response model to promote restoration of the Mediterranean oak *Quercus ilex*. *New Forests* 46: 795-812.
- Uscola, M., Villar-Salvador, P., Oliet, J., Warren, C.R. 2017. Root uptake of inorganic and organic N chemical forms in two coexisting Mediterranean forest trees. *Plant and Soil* 415: 387-392.
- Valverde-Asenjo, I., García-Montero, L.G., Quintana, A., Velázquez, J. 2009. Calcareous amendments to soils to eradicate *Tuber brumale* from *T. melanosporum* cultivations: A multivariate statistical approach. *Mycorrhiza* 19: 159-165.
- Vargas Ríos, O. 2011. Ecological restoration: biodiversity and conservation. *Acta biol. Colomb* 16: 221-246.
- Villar-Salvador, P., Heredia, N., Millard, P. 2009. Remobilization of acorn nitrogen for seedling growth in holm oak (*Quercus ilex*), cultivated with contrasting nutrient availability. *Tree Physiology* 30: 257-263.
- Villar-Salvador, P., Peñueñas, J.L., Nicolás-Peragón, J.L., Benito, L.F., Domínguez-Lerena, S. 2013. Is nitrogen fertilization in the nursery a suitable tool for enhancing the performance of Mediterranean oak? *New Forest* 44: 733-751.
- Villar-Salvador, P., Puértolas, J., Cuesta, B., Peñuelas, J.L., Uscola, M., Heredia-Guerrero, N., Rey Benayas, J.M. 2012. Increase in size and nitrogen concentration enhances seedling survival in Mediterranean plantations. Insights from an ecophysiological conceptual model of plant survival. *New Forests* 43: 755-770.
- Villar-Salvador, P., Uscola, M., Jacobs, D.F. 2015. The role of stored carbohydrates and nitrogen in the growth and stress tolerance of planted forest trees. *New Forests* 46: 813-839.
- Vitousek, P.M., Howarth, R.W. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13: 87-115.
- Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. 2016. True Truffle (*Tuber* spp.) in the World: Soil Ecology, systematics and biochemistry. Springer, Switzerland.
- Zavala, M.A., Espelta, J.M., Retana, J. 2000. Constraints and trade-offs in Mediterranean plant communities: the Case of holm oak-Aleppo pine forests. En *The Botanical Review*, pp. 120-147.

Material suplementario

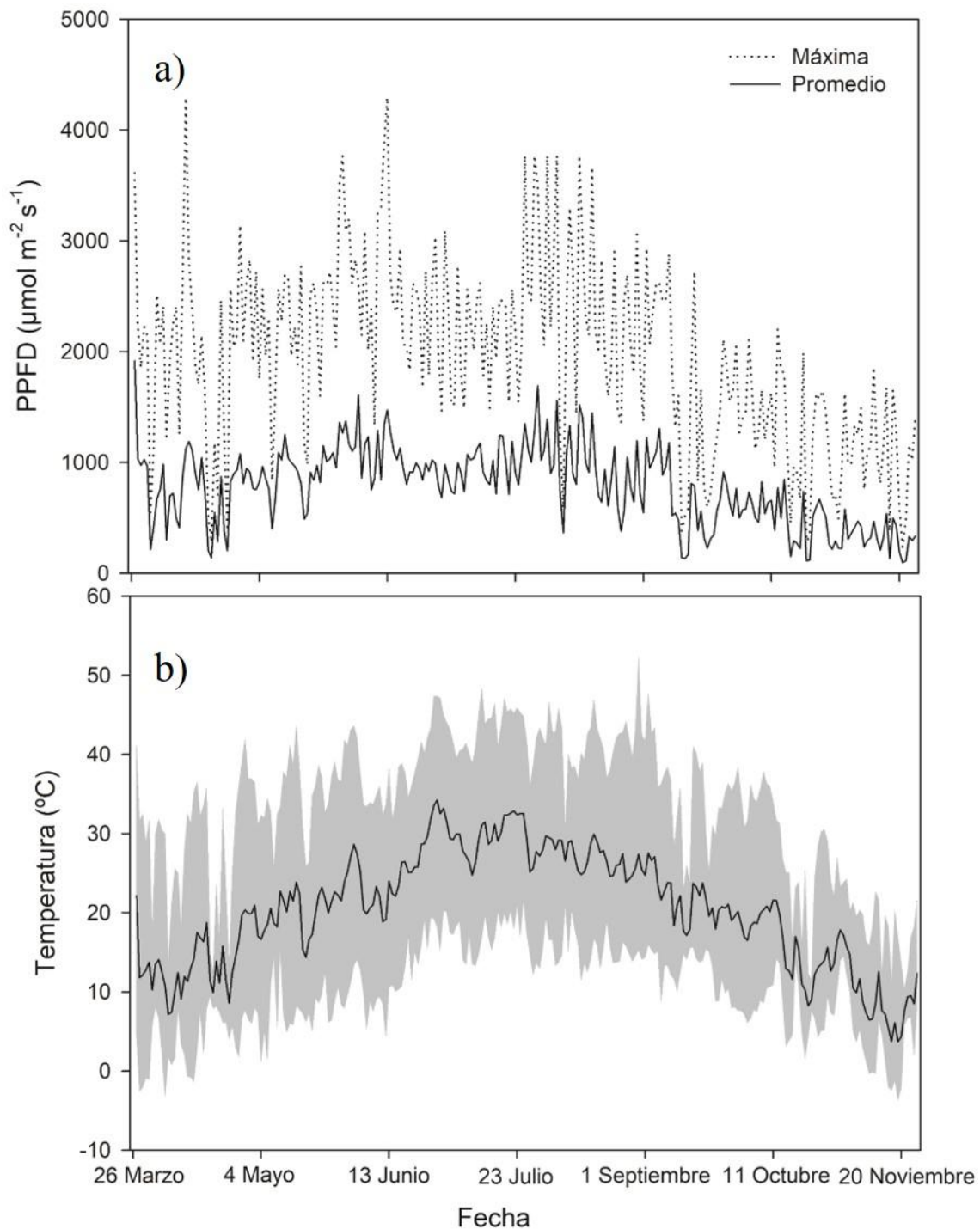


Figura S1. Radiación diaria máxima y promedio de las horas de sol (a) y temperatura diaria media (línea continua) (b) en el interior del túnel de cultivo dónde se encontraban las plántulas de *Quercus ilex*. El área sombreada en la subfigura b representa las temperaturas máximas y mínimas diarias. Los datos son los promedios de dos sensores grabadores de datos de temperatura y radiación (Pendant Temp/luminosidad, Onset, EEUU), ubicados en puntos separados del túnel de cultivo a la misma altura que las plantas, aunque sin recibir sombra de ellas y programados para tomar datos cada hora.